



SEERUMIN KORVIKKEEN KONSENTRAATION VAIKUTUS RPE-ERILAISTUKSESSA

Sirja Kuusisto

Opinnäytetyö
Marraskuu 2014
Laboratorioalan
koulutusohjelma

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratorioalan koulutusohjelma

KUUSISTO, SIRJA:

Seerumin korvikkeen konsentraation vaikutus RPE erilaistuksessa

Opinnäytetyö 45 sivua, joista liitteitä 8 sivua
Marraskuu 2014

Pluripotentit kantasolut pystyvät erilaistumaan kaikiksi aikuisen yksilön solutyypeiksi. Tämän ominaisuuden vuoksi niiden käyttöä pidetään lupaavana hoitokeinona erilaisten sairauksien hoidossa. Silmän verkkokalvon ikärappeuma on yleisin sokeutta aiheuttava tauti. Pluripotentista kantasoluista erilaistettua verkkokalvon pigmenttiepiteelisolut (RPE-solut) saattavat tulevaisuudessa toimia solusiirteinä taudin hoitokeinona. Erilaistukselle täytyy kuitenkin löytää optimaaliset olosuhteet ilman eläinperäisiä tuotteita.

Erilaistus voidaan tehdä spontaanisti poistamalla kasvutekijät tai ohjaamalla sitä erilaisten kasvutekijöiden avulla. Pluripotenttien kantasolujen kasvatukseen käytetty kasvatusliuos on muuten sama kuin spontaaniin erilaistukseen käytetty kasvatusliuos, mutta siitä on poistettu erilaistumista estävä kasvutekijä.

Tässä tutkimuksessa vertailtiin kasvatusliuoksen sisältämän seerumin korvikkeen konsentraation vaikutusta spontaanissa RPE erilaistuksessa. Seerumin korvike on kallis reagenssi, joten sen määrän mahdollinen vähennys auttaisi laskemaan solujen ylläpitokustannuksia. Tutkimuksessa käytettiin tutkimusryhmän itse pystyttämää alkion kantasolulinjaa ja lahjoituksena Timo Otonkosken ryhmältä saatua indusoitua pluripotenttia kantasolulinjaa. Solujen kehitystä ja erilaistumista seurattiin silmämääräisesti tarkkaillen ja kypsät solut karakterisoitiin. Silmämääräisesti tarkkailtiin melaniinipigmentin ilmestymistä. Eri karakterisointimenetelmillä tahdottiin tutkia ovatko solut erilaistuneet RPE-solujen kaltaisiksi. Pigmentoituneiden solujen määrää kvantitoitiin, solujen morfologiaa arvioitiin ja soluista tutkittiin RPE-spesifisiä geenejä: MITF, Bestrophin-1, TYR ja RPE65 ja proteiineja: Bestrophin-1 ja MITF.

Kaikilla tutkituilla seerumin korvikekonsentraatioilla saatiin kasvatettua kypsiä RPE-solujen kaltaisia soluja. Tuloksista ei käynyt yksiselitteisesti ilmi paras konsentraatio. Silmämääräisesti tulokset vaikuttivat kuitenkin heikommilta pienillä pitoisuuksilla. Aihetta on siis hyvä tutkia lisää optimaalisen pitoisuuden selvittämiseksi.

Asiasanat: pluripotentti kantasolu, solujen erilaistus, verkkokalvo, verkkokalvon pigmenttiepiteeli, RPE-solu, seerumin korvike, karakterisointi

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Laboratory Sciences

KUUSISTO, SIRJA:

Influence of serum replacement concentration on RPE differentiation

Bachelor's thesis 45 pages, appendices 8 pages
November 2014

Pluripotent stem cells can differentiate into any adult cell types. This is why their usage as a treatment in different diseases is considered promising. Retinal degenerations are the leading cause of vision loss in the Western world. In the future retinal pigment epithelium cells (RPE cells) derived from pluripotent stem cells can be used as a cure for these diseases in the form of cell transplantations. Optimal conditions for the differentiation without animal origin need to be discovered.

Differentiation can be done spontaneously with growth factor removal or controlled with assistance of different growth factors. The culture medium used in spontaneous differentiation is otherwise the same as the one used with pluripotent stem cells except it lacks the growth factor that prevents the differentiation.

In this study the effects of different concentrations of serum replacement on spontaneous differentiation were compared. Serum replacement is an expensive reagent so the possible reduction of its amount would lower the cell maintenance costs. The cell lines used in this study were the embryonic stem cell line derived by the research group and the induced pluripotent stem cell line which was a donation from another research group led by Timo Otonkoski's. The development and differentiation was evaluated visually and RPE characters were evaluated from mature cells. Pigmentation appearance were observed visually. Different characterization methods were used to figure out if the cells were differentiated into RPE-like cells. The amount of pigmented cells was quantified, cell morphology was evaluated and the RPE specific genes MITF, Bestrophin-1, TYR and RPE65 and proteins MITF and Bestrophin-1 were analyzed from the cells.

Mature RPE-like cells were successfully differentiated in all different serum replacement concentrations in the study. The outcome did not indicate exact results for the best concentration. However, the results showed that differentiation seemed to be weaker at low concentrations. It is therefore good to continue the examination of the optimal concentration.

Key words: pluripotent stem cell, cell differentiation, retina, retinal pigment epithelium, RPE cell, serum replacement, characterization

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	6
2	TEOREETTINEN TAUSTA	7
2.1	Kantasolut	7
2.1.1	Alkion kantasolut	7
2.1.2	Indusoidut pluripotentit kantasolut	8
2.2	Verkkokalvo ja verkkokalvon pigmenttiepiteelisolut	8
2.2.1	Verkkokalvon pigmenttiepiteelisolujen rakenne ja toiminta	10
2.2.2	Verkkokalvon pigmenttiepiteelisolujen erilaistus pluripotentista kantasoluista	12
2.2.3	Erilaistettujen solujen karakterisointi	13
2.3	Reverse transcription PCR (RT-PCR)	14
2.4	Immunosytokemiallinen värjäys	15
3	TUTKIMUKSEN TAVOITTEET	17
4	MATERIAALIT JA MENETELMÄT	18
4.1	Solulinjat	18
4.1.1	Soluviljely	18
4.1.2	Kasvatusliuokset	19
4.2	Mikroskopointi	20
4.3	Sytospin	21
4.4	Immunosytokemialliset värjäykset	22
4.5	RT-PCR	24
4.5.1	RNA eristys	24
4.5.2	cDNA kääntö	25
4.5.3	PCR-reaktio	26
5	TULOKSET	28
5.1	Erilaistuksen tehokkuuden arviointi	28
5.2	Erilaistumisen ja kypsyyden arviointi	30
5.2.1	Solujen erilaistuminen ja morfologia	30
5.2.2	Geenien ilmentyminen	33
	POHDINTA	34
	LÄHTEET	36
	LIITTEET	38
	Liite 1. Sytospinlaskut	38
	Liite 2. Immunosytokemiallisten värjäysten tulokset taulukoituna	41
	Liite 3. NanoDrop tulokset	45

ERITYISSANASTO

AMD	Verkkokalvon ikärappeuma
A116	Indusoitu pluripotentti kantasolulinja
Bestrophin-1	RPE-spesifi proteiini
BMT	BioMediTech
BSA	Bovine serum albumin
DAPI	4',6-diamino-2-phenylindole
DM-	DMEM pohjainen perus kasvatusliuos
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
EMC	Extracellular matrix
hESC (hES)	Ihmisen alkion kantasolu
hiPSC (iPS)	Ihmisen indusoitu pluripotentti kantasolu
HS	Ihmisen seerumi
KO-SR	Knockout Serum Replacement
MITF	PPE-spesifi proteiini microphthalmia-associates transcription factor
m-RNA	Lähetä RNA
PFA	Paraformaldehydi
PBS	Phosphate buffer saline
Regea 08/023	Tutkimusryhmän itse derivoima alkion kantasolulinja
RPE	Verkkokalvon pigmenttiepiteeli, Retinal Pigment Epithelium
RPE65	RPE-spesifi proteiini 65kDa
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
<i>Taq</i> -polymeraasi	Bakteerista eristetty entsyymi joka toimii korkeissa lämpötiloissa
TYR	RPE-spesifi proteiini Tyrosinase
Western blotting	Immunodetektiotekniikka jolla voidaan tunnistaa elektroforeettisesti erotellut proteiinit vasta-aineiden avulla

1 JOHDANTO

Pluripotentit kantasolut voivat erilaistua kaikiksi solutyypeiksi. Ne voivat jakautua loputtomasti ja uusiutua kantasoluina. Tätä ominaisuutta käytetään hyödyksi klinisiin hoitoihin tähtäävässä tutkimuksessa. Kudosteknologiset menetelmät ovat tulevaisuudessa potentiaalisia hoitomuotoja erilaisiin sairauksiin, kuten silmän verkkokalvon ikärappeumaan.

Opinnäytetyössä keskityttiin kantasolujen erilaistamiseen silmän verkkokalvon pigmenttiepiteelisoluiksi eli RPE-soluiksi. Työssä vertailtiin erilaistamiseen käytössä olevalle kasvatusliuoksessa käytetylle seeruminkorvikkeelle vaihtoehtoisia konsentraatioita. Vertailussa oli neljä eri konsentraatiota. Erilaistumista seurattiin aluksi mikroskoopin avulla tarkkaillen solujen morfologiaa ja pigmentaatiota. Erilaistuksen aikana solut ruokittiin säännöllisesti testiliuoksilla. Erilaistumisen onnistumista eri seerumin korvikkeen konsentraatioissa arvioitiin lopuksi seuraamalla pigmentaation määrää. Tämän lisäksi vertailtiin RPE-spesifien proteiinien ilmentymistä eri konsentraatioissa.

Työ tehtiin Tampereen yliopiston Biolääketieteellisen teknologian yksikössä, (BioMediTech, BMT), silmäryhmässä. Ryhmän johtajana toimii FT, Suomen Akatemian tutkija Heli Skottman. Opinnäytetyön ohjaajana toimi FM Hanna Hiidenmaa ja käytännön ohjaajana bioanalyttikko Hanna Koskenaho. Lisäksi käytännön apua ja ratkaisuja ongelmiin tarjosivat myös muut tutkimusryhmän jäsenet FT Tanja Ilmarinen, FT Kati Juuti-Uusitalo, laboratorioanalyttikko Elina Konsén, bioanalyttikko Outi Melin, FM Alexandra Mikhailova ja DI Anni Sorkio.

2 TEOREETTINEN TAUSTA

2.1 Kantasolut

Kantasolut ovat soluja, joilla on kyky erilaistua eri solutyypeiksi. Ne myös muodostavat sisäisen korjausjärjestelmän moniin kudoksiin. (Introduction 2014, Kantasolut 2014.) Kantasolut voidaan luokitella erilaistuskäytönsä perusteella toti-, pluri- ja multipotentteihin. Totipotentit kantasolut voivat erilaistua kaikiksi solutyypeiksi. Pluripotentit kantasolut voivat erilaistua miksi tahansa kolmesta alkiokerroksen solutyypeistä: ektodermi, mesodermi ja endodermi (Bongso & Lee 2005, 1–14). Jakautuessaan pluripotentteillä kantasoluilla on valmiudet joko pysyä kantasoluna tai erilaistua miksi tahansa aikuisen solutyypiksi, kuten lihassoluksi (Introduction 2014, Kantasolut 2014.) Multipotentit kantasolut voivat erilaistua vain tiettytyypisiksi soluiksi (Bongso & Lee 2005, 1–14).

2.1.1 Alkion kantasolut

Hedelmöittyessään munasolu jakautuu ja näin syntyy tytär溶u. Hedelmöittynyt munasolu (morula) on totipotentti, eli se pystyy erilaistumaan miksi tahansa solutyypiksi. Alkion kehittyessä alkaa plastokystin, eli alkiorakkulan, sisempi pluripotentti solumassa erilaistua. Syntyy kolme solukerrosta endo-, ekto- ja mesodermi. Myöhemmin kehityksen aikana endodermaalisista soluista kehittyy ruuansulatuskanavan, hengitysteiden ja keuhkojen epiteelisolut. Ektodermaalisista soluista kehittyvät hermosolut ja ihon epiteelisolut ja mesodermaalisista soluista sidekudoksen, lihaksen ja veren solut. (Kantasolut 2014.)

Ennen pluripotentin solumassan erilaistumista neljän päivän ikäinen blastokysti koostuu kolmesta osasta: blastocelstä, joka on nesteen täyttämä ontelo, blastomeerisolusta, jotka muodostavat sisäsolumassan ja trofoblasteista, litteistä soluista, jotka muodostavat blastokystin epiteeliseinämän. (Kehitysbiologia 2014.) Alkion kantasolulinja (human embryonic stem cell, hESC) pystytetään eristämällä sisäsolumassa blastokystistä.

Solut viljellään maljalle, jossa on pohjalla tukisolukko, joka auttaa estämään solujen erilaistumisen. Aluksi tukisolukkona käytettiin hiiren sikiön fibroblastisoluja, sitten pyrittiin käyttämään ihmissoluja mahdollisten tarttuvien patogeenien välttämiseksi, mutta nykyään pitkälti käytetään feeder free-menetelmiä, joissa tukisolut on korvattu EMC-proteiineilla. (Thompson ym.1998, Hovatta ym. 2003, Kantasolut 2014.)

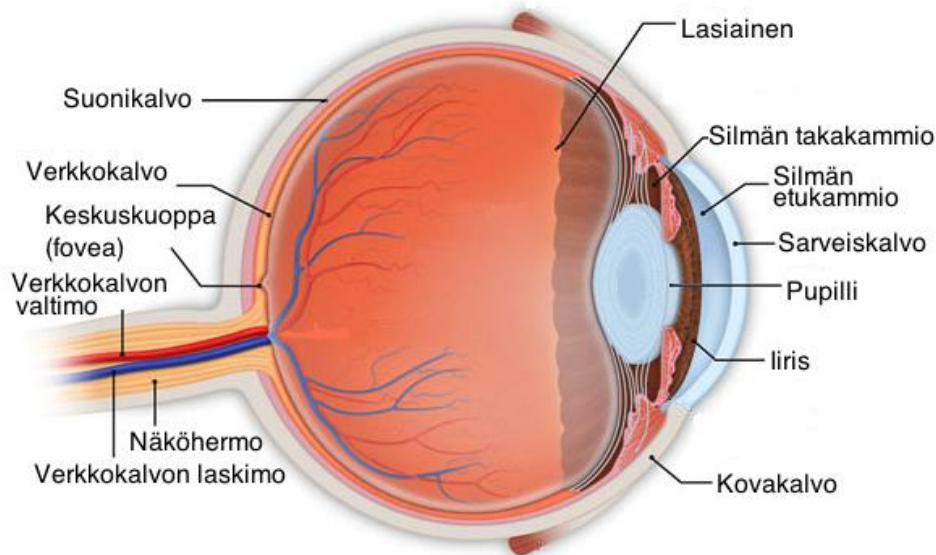
Tutkimuksissa käytetyt alkioit saadaan lahjoituksena koeputkihedelmöityksessä käyneiltä pareilta. Molemmat osapuolet antavat kirjallisen suostumuksensa. BMT:ssä käytetään vain hoitoihin kelpaamattomia alkioita, jotka olisi hävitetty, ellei niitä olisi lahjoitettu tutkimukseen. (BioMediTech 2014.)

2.1.2 Indusoidut pluripotentit kantasolut

Indusoidut pluripotentit kantasolut (iPS-solut) geneettisesti uudelleenohjelmoidaan alkion kantasolujen kaltaisiksi pluripotentiksi kantasoluiksi. iPS-soluja voidaan tuottaa somaattisista soluista, kuten ihon sidekudossoluista. Kuten alkion kantasoluja, myös iPS-soluja voidaan manipuloida erilaistumaan halutuksi solutyypiksi. Tämä saattaa tulevaisuudessa mahdollistaa potilaiden omien solujen käytön korvaushoidoissa. Omista iPS-soluista tehdyt solusiirteet ja kudokset poistaisivat eettiset ja hyljintäreaktioihin liittyvät ongelmat. (BioMediTech 2014, Induced pluripotent stem cells 2014.)

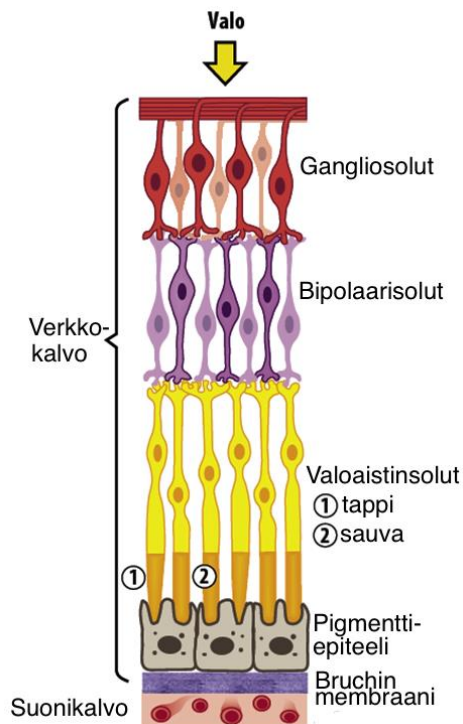
2.2 Verkkokalvo ja verkkokalvon pigmenttiepiteelisolut

Silmän valoon reagoiva ja näkevä osa on verkkokalvo (retina). Se on kehittynyt keskushermostosta ja on rakenteeltaan samankaltainen. Verkkokalvo on läpinäkyvä, ohut ja hauras hermokudoskerros. Se vastaanottaa ja muokkaa näköinformaatiota aivojen tulkittavaksi. Verkkokalvon reseptorit vastaanottavat valoenergian ja muuttavat sen hermoimpulsseiksi. Tämä tapahtuu tavalla, joka on yleensä aivoille ominaista. Aivot muokkaavat saadun tiedon tarkaksi näköaistimukseksi, kuten syvyys- ja värinäöksi. (Nienstedt ym. 2004, 502–503, Kivelä 2011, 25.)



Kuva 1. Silmän rakenne (mukaillen Retina Associates 2014)

Verkkokalvo on silmän seinämän sisin kerros. Kuvasta 1 nähdään silmän rakenne ja eri osien sijoittuminen. Verkkokalvo koostuu karkeasti jaettuna viidestä osasta. Ensimmäisenä kerroksena on gangliosolukerros. Seuraavana on biopolaarisolukerros, joka yhdistää valoistinsolun gangliosoluun. Sitten tulevat valoistinsolut, joita on kahta tyyppiä, tappisoluja ja sauvasoluja. Ne sisältävät näköpigmentin. Valo saa aikaan kemiallisen reaktion vaikuttaessaan sauva- ja tappisoluihin. Tämän seurauksena syntyy näköhermon impulssi. Sauvasolut toimivat vähäisessä valaistuksessa ja vastaavat hämäränäöstä. Tappisolut toimivat voimakkaammassa valaistuksessa kuin sauvasolut ja ovat erikoistuneet värien erottamiseen. Verkkokalvon takaosassa on keltainen alue, jota kutsutaan makulaksi. Sen keskellä on tarkan näkemisen alue, keskuskuoppa, fovea. Tarkimmasta näöstä vastaa foveassa oleva kuopake (foveola). Siellä on valtaosa tappisoluista, eikä ollenkaan sauvasoluja. Valoistinsolujen yhteydessä on pigmenttiepiteelikerros (RPE). Se on verkkokalvon alin kerros, joka ylläpitää verkkokalvon toimintoja monin tavoin. Ennen suonikalvoa on vielä Bruchin membraani. Se sitoo pigmenttiepiteelisolut paikalleen ja aineenvaihdunta suonikalvolta toimii sen läpi. Verkkokalvon osat on esitetty kuvassa 2. (Immonen ym. 2011, 232, Kaarniranta ym.2003, Kivelä 2011, 27–28, Nienstdt ym. 2011, 503–504, Välimäki 2012.)



Kuva 2. Verkkokalvon rakenne (mukaiillen Välimäki 2012)

2.2.1 Verkkokalvon pigmenttiepiteelisolujen rakenne ja toiminta

Verkkokalvon uloimmassa osassa sijaitsevat pigmenttiepiteelisolut (Retinal Pigment Epithelium, RPE). RPE-solut muodostavat yksikerroksisen epiteelin, joka koostuu kuu-sikulmaisista soluista. Soluissa on paljon melaniinijyväsä. Valoastinsolujen ja pig-menttiepiteelin välissä on paljon soluväliainetta, jonka kautta niiden aineenvaihdunta toimii. (Kaarniranta ym. 2003, Kaarniranta ym. 2009, Kivelä 2011, 28, Immonen ym. 2011, 232.)

RPE-solut absorboivat valoenergiaa. Ne muodostavat tumman, pigmentoidun ja suojaa-van seinämän, joka auttaa hajallaan olevan, hermosolukerroksen läpi päässeeseen valon absorptiossa. RPE-solut myös kuljettavat vettä, metabolisia lopputuotteita ja ioneita verkkokalvolta verenkiertoon. Solut ottavat verestä myös ravinteita kuten glukoosia ja rasvahappoja ja toimittavat ne valoastinsoluille. Tärkeimpänä tehtävänä RPE-solut osallistuvat näköpigmenttien aineenvaihduntaan. Valoastinsolujen näköpigmentti iso-merisoituu trans-muotoon valoabsorbtion jälkeen. Ne eivät kuitenkaan pysty itse palaut-tamaan pigmenttiä tarvitsemaansa cis-muotoon vaan se kuljetetaan RPE-soluille. Ne muokkaavat näköpigmentin tarvittuun muotoon ja palauttavat sen valoastinsoluille.

RPE-solut toimivat valoaistinsolujen huoltajina ja mahdollistavat niiden olemassaolon. Tälle tehtävälle on tärkeää vakauttaa ionikoostumus valoaistinsolujen ympärillä. Toinen tärkeä huoltotehtävä on valoaistinsolujen hajonneiden ulkojaokkeiden kärkiosien fagocytoosi. Jopa 10 % ulkosegmentistä hajotetaan päivittäin. RPE-solujen fagocytoosiomaisuus on poikkeava, koska massa jonka ne hajottavat päivittäin, on moninkertainen esimerkiksi makrofageihin verrattuna. Lisäksi RPE-solut erittävät kasvutekijöitä, jotka muun muassa vaikuttavat valoaistinsolujen rakenteen säilymiseen ja immunosuppressiivisia tekijöitä, jotka auttavat silmän immuunipuolustuksessa. (Kaarniranta ym. 2003, Kivelä 2011, 28, Strauss 2005.)

Pigmenttiepiteelisolujen toiminta on näkökyvylle olennaista. Koska ne eivät uusiudu, saattaa minkä tahansa toiminnan häiriö niissä aiheuttaa näön heikkenemistä tai sokeutumista. Verkkokalvon ikärappeuma (age-related macular degeneration, AMD) on merkittävin länsimaissa näkövammaisuutta aiheuttava sairaus. Se heikentää kauko- ja lähinäköä ja aiheuttaa värinäön heikentymistä ja tekstin ja rajapintojen väärentymistä. Ikärappeuman jonkinasteista muotoa havaitaan jo jopa 55-vuotiailla. Verkkokalvon ikärappeuman riskin lisääntymiseen vaikuttavat iän lisäksi monet tekijät, muun muassa elintavoista johtuva korkea painoindeksi tai verenpaine, rasvaisen ja korkean glykeemisen indeksin ruoka-aineiden suuri kulutus ja puolestaan hyvien rasvojen kuten rasvaisen kalan ja värikkäiden kasvien vähäinen kulutus. Myös tupakoinnin on osoitettu kasvattavan riskiä. Lisäksi riskiin vaikuttavat geneettiset tekijät. Näistä tärkeimmät ovat komplementin säätelijäproteiini-H:n ja toiminnaltaan epäselvän LOC/HTRA 1-geenin polymorfia. (Immonen ym. 2011, 251–255, Kaarniranta ym. 2003, Kaarniranta ym. 2009, Kivelä 2011, 28, Strauss 2005.)

Verkkokalvon ikärappeuma voidaan jakaa kahteen ryhmään. Siitä esiintyy kuiva (atrofinen) ja nesteinen (kosteaneovascular) muoto. Molemmat tulevat yleensä ilmi vain silmänpohjatutkimuksessa. Ikääntyessään pigmenttiepiteelisolujen kyky pilkkoa ulkosegmentin osia heikkenee ja soluun alkaa kerääntyä lipofuskiinia, joka on RPE-solulle toksista. Lisäksi solun ulkopuolelle, RPE-solun ja Bruchin kalvon väliin, alkaa muodostua druseneiksi kutsuttuja kerääntymiä. 90 % kaikista verkkokalvon ikärappeumista on kuivaa muotoa. Se on hitaasti etenevä sairaus, joka aiheuttaa makula-alueella pigmenttiepiteelin ja sensorisen retinan solujen lisääntyvää kutistumista ja tuhoutumista. Muodostuneet drusenit saattavat irrottaa RPE-soluja Bruchin kalvosta. Kuiva ikärappeuma muodostuu silmiin molemminpuolisesti. Näkö heikkenee, mutta apuvälineiden

avulla pystytään kuitenkin lukemaan. Kuivaa muotoa harvinaisempaa kosteaa ikärappeumaa on vain 10 % tapauksista. Se saattaa muodostua vain toiseen silmään. Siinä drusenit alkavat suurentua ja saattavat kasvaa yhteen. RPE-soluja irtoaa Bruchin kalvosta laajemmin kuin kuivassa rappeumassa. Kosteassa ikärappeumassa Bruchin kalvon pienistä vuotokohdista vuotaa läpi nestettä, joka voi paikallisesti irrottaa pigmenttiepiteeliä. Vuoto saattaa kulkeutua myös epiteelin läpi neuroepiteelin alle. Bruchin kalvon vauriokohdista kasvaa uudissuonia RPE- ja hermosolukerrokseen. Taudin myöhäisessä vaiheessa kehittyvät sidekudosarpiat, jotka viimeistään aiheuttavat näön menetyksen. (Immonen ym 2011, 251–255, Kaarniranta ym. 2003, Kaarniranta ym. 2009, Kivelä 2011, 28.)

Verkkokalvon ikärappeumaan ei ole hoitokeinoja. Kosteaa ikärappeuman etenemistä voidaan hidastaa. Uudissuonituksen tuhoaminen hidastaa rappeuman etenemistä ja pehmeiden drusenien laserhoito saattaa estää kostean rappeuman syntyä. (Kaarniranta ym. 2003.) Nykyistä pysyvämpien hoitotulosten saavuttamiseksi AMD:n hoidossa kudos teknologia ja solusiirteet ovat lupaavimpia vaihtoehtoja. Ihmisen pluripotentit kantasolut saattavat tarjota vastauksen hoitokeinon kehittämiseksi. Useat tutkimusryhmät ovat saaneet onnistuneesti erilaistettua RPE-soluja alkion kantasoluista ja indusoiduista pluripotentista kantasoluista. (Carr ym. 2012, Klimanskaya 2004, Rowland 2012.) Eläinkokeissa näillä erilaistetuilla RPE-soluilla on saatu parannettua visuaalisia toimintoja ja hidastettua valoistinsolujen katoa. Vaikutukset ovat kuitenkin kestäneet vain hetken ja istutetut solut häviävät ensimmäisten kuukausien aikana. (Vaajasaari ym. 2012.)

2.2.2 Verkkokalvon pigmenttiepiteelisolujen erilaistus pluripotentista kantasoluista

RPE-soluja voidaan erilaistaa alkion kantasoluista ja iPS-soluista. Erilaistus voidaan tehdä joko spontaanisti tai ohjaamalla erilaistusta erilaisten kasvutekijöiden avulla (Carr 2012, Rowland 2012). Spontaanissa erilaistuksessa hES-solut kasvavat adherenttina tukisolukkona käytettyjen fibroplastisolujen päällä ja niiden annetaan kasvaa kolonoidien rajojen yli. Kun niistä tulee monikerroksisia, aloitetaan erilaistus. Kasvutekijän poisto (yleensä basic fibroblast growth factor, bFGF) kasvatusliuoksesta aiheuttaa spontaanin erilaistumisen. Spontaanin erilaistumisen käynnistyttyä solujen voidaan antaa erilaistua adherenttina tai leikata ne 1–7 päivän kuluessa aloituksesta manuaalisesti kuu-

si-kuoppalevyille, jossa ne muodostavat kelluvia soluaggregatteja (embryoid bobbies, EB). Noin 1–8 viikon kuluessa pigmentoituneita pesäkkeitä alkaa muodostua. Ajan kuluessa nämä kohdat kehittyvät ja laajenevat. Kun pesäkkeet ovat riittävän suuria (suunnilleen viikoilla 6–14), ne voidaan mekaanisesti erotella omaksi RPE:tä muistuttavaksi populaatioksi. (Carr ym. 2012, Klimanskaya ym. 2004, Rowland ym. 2012, Vaajasaari ym. 2011.)

Kliinisiin sovelluksiin RPE-solujen tuottoon tarvitaan Good Manufacturing Practise (GMP) hyväksytty menetelmä. Koska eläinperäiset aineet aiheuttavat potilaalle eläinpatogeenitartunnan riskin, pyritään kasvatusolosuhteista korvaamaan eläinperäiset aineet. (Vaajasaari ym. 2011.) KO-SR on kehitetty pluripotenttien solujen viljelyyn. Pyrkimyksenä on ollut vähentää eläinperäisiä aineita ja korvata seerumi (FBS) käytetyissä menetelmissä. KO-SR:kin sisältää kuitenkin Albumaxia, jossa on naudan seerumin albumiinia (BSA) (Life Technologies 2014). KO-SR on mukana spontaanissa erilaistuksessa. Sen konsentraation vaikutusta erilaistumiseen ei ole aikaisemmin raportoitu. Koska KO-SR on kallis ja sen konsentraatio saattaa vaikuttaa solujen erilaistumiseen ja kypsymiseen, on eri konsentraatioiden vaikutusta tärkeää tutkia.

2.2.3 Erilaistettujen solujen karakterisointi

Pluripotentteista soluista erilaistetut RPE-solujen kaltaiset solut pitää karakterisoida toiminnallisella ja molekylaarisella tasolla (Klimanskaya 2006). On tarkistettava, että erilaistus on onnistunut, koska pelkän pigmentaation perusteella ei voida vielä varmistua, että solut ovat RPE-soluja. RPE-vastaavuutta arvioidaan muun muassa tutkimalla RPE:lle tyypillisten geenien ja proteiinien ilmentymistä erilaistetuista soluista, tai tutkimalla solujen toiminnallisuutta, kuten esimerkiksi kykyä erittää kasvutekijöitä tai fagosytointikykyä. RPE-soluille tyypillisiä markkereita, geenejä ja proteiineja, on monia.

Esimerkkejä näistä RPE-markkereista ovat Bestrophin-1, RPE:n toiminnan kannalta tärkeä proteiini, jonka varsinaista tarkoitusta ei tunneta (Genetics Home Reference 1 2014), MITF (microphthalmia-associated transcription factor), joka auttaa pigmenttiä tuottavien solujen toiminnan ja kehityksen kontrolloimisessa (Genetics Home Reference 2 2014), RPE65 (Retinal Pigment Epithelium-specific protein 65kDa) osallistuu näköpigmentin uudistamiseen (Genetics Home Reference 3 2014) ja Tyrosinase-entsyymi (TYR), joka on vastuussa melaniin alkuvaiheen tuotannosta (Genetics Home Reference 4 2014). (Klimanskaya 2006.) Tässä tutkimuksessa tutkittiin ensin RPE:lle tyypillisten geenien (bestrophin, MITF, RPE65, TYR) ilmentymistä RT-PCR-menetelmällä. Lisäksi proteiinien (Bestrophin-1 ja MITF) ilmentymistä tutkittiin immunosytovärjäyksin. (Vaajasaari ym. 2011.)

2.3 Reverse transcription PCR (RT-PCR)

Polymeraasiketjureaktio, polymerase chain reaction eli PCR, on tapa kasvattaa DNA:n määrää ilman sen kloonamista. Minkä tahansa valitun DNA-näytteen määrää voidaan lisätä ilman, että haluttu DNA jouduttaisiin eristämään koko näytteestä. PCR kopioi halutusta DNA-sekvenssistä molemmat juosteet. (Campbell & Farrell 2008, 386.)

DNA-synteesin automatisoinnin onnistuminen vaatii korkean lämpötilan. Tämä siksi, että juosteet saadaan eroteltua toisistaan. Ongelmana jopa 90 °C:een lämpötilassa olisi se, että DNA-juostetta normaalisti tekevät polymeraasit denaturoituvat, eivätkä pysty suorittamaan tehtäväänsä. Ongelma ratkaistiin kovissa, jopa yli 100 °C:een lämpötiloissa elävien bakteerien avulla. Kovissa olosuhteissa elävien bakteerien entsyymien on myös pystyttävä toimimaan korkeissa lämpötiloissa. Kuumissa lähteissä elävästä bakteerista *Thermus aquaticuksesta* eristettiin polymeraasi, jota voidaan käyttää DNA:n syntetisointiin. Tämä polymeraasi on yleisimmin PCR:ssä käytetty ja nimeltään *Taq*-polymeraasi. (Campbell & Farrell 2008, 386.)

PCR-reaktiossa on kolme vaihetta: denaturointi, annealing ja pidennysreaktio. Aluksi DNA:n juosteet erotetaan toisistaan kuumentamalla. Tätä kutsutaan denaturoimiseksi. Sen jälkeen lämpötilaa lasketaan ja lisätään ylimäärä lyhyitä oligonuklotideja eli alukkeita. Alukkeet kiinnittyvät templaattiin, eli tapahtuu annealing-reaktio. Alukkeet ovat komplementaarisia monistukseen valittujen päiden kanssa. Kun alukkeet ovat kiinnitty-

neet, lämpötilaa nostetaan *Taq*-polymeraasille sopivaksi, jolloin alkaa uuden DNA:n syntetisointi alukseen 3'-päästä. Tässä pidennysreaktiossa templaatit kasvavat 5'-suunnasta 3'-suuntaan. *Taq*-polymeraasin annetaan toimia kunnes haluttu pituus on saavutettu. Ensimmäisen reaktiosarjan, eli syklin, jälkeen halutun DNA:n määrä on kaksinkertaistunut. Syklejä voidaan toistaa haluttu määrä peräkkäin ja näin tuottaa suuria määriä DNA:ta. Syntetisointi kestää noin tunnin ja syklien määrä on yleensä 25–40. (Campbell & Farrell 2008, 386.)

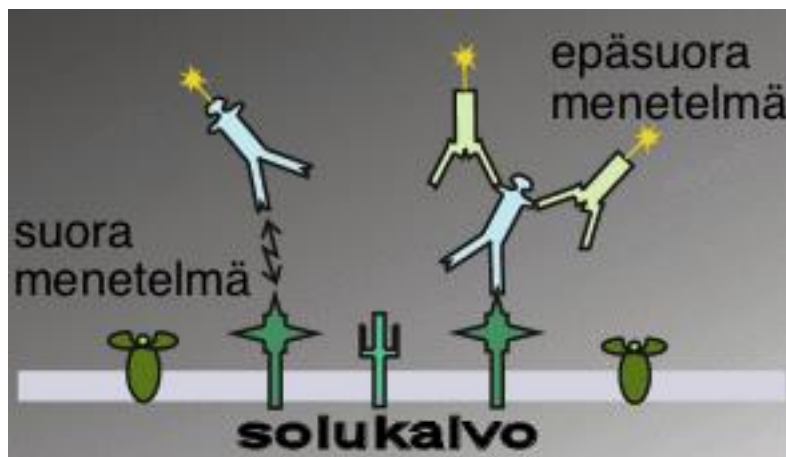
Yleensä geneettinen informaatio kulkee suuntaan DNA-transkriptio-RNA. Käänteisessä transkriptiossa (reverse transcription, RT) prosessi kulkee vastakkaiseen suuntaan. Lähetä-RNA koodataan *reverse transcriptase* entsyymillä avulla komplementaariseksi DNA:ksi. (Campbell & Farrell 2008, 261.) Eli RT-PCR:ssä käännetään m-RNA komplementaariseksi DNA:ksi, joka monistetaan. Tässä tutkimuksessa RT-PCR:n avulla selvitettiin olivatko erilaistetut solut haluttuja RPE-solun kaltaisia. Haluttiin selvittää ilmentävätkö erilaistetut solut RPE-soluille tyypillisiä geenejä.

2.4 Immunosytokemiallinen värjäys

Immunosytokemialliset värjäykset perustuvat immunologiaan. Niiden avulla voidaan selvittää antigeenin tai vasta-aineen sijaintia ja määrää tutkittavasta näytteestä valo- tai elektronimikroskooppisesti. Paikantaminen perustuu vasta-aineen ja antigeenin spesifiseen sitoutumiseen. Detektoinnin apuna käytetään merkkiaineita, leimoja, jotka eivät häiritse reaktion biologista aktiivisuutta. (Immunosytokemia 2014, Colonel ym. 2006, 109–110.)

Värjäyksessä käytetään erilaisia leimaustapoja. Vasta-aineeseen liitetään jokin merkkiaine, joka määräytyy käytettävästä tavasta. Fluoresenssimikroskopiassa käytetään fluoresoivia aineita, joista yleisin on fluorokromi, elektronimikroskopiassa leimataan kolloidisella kullalla tai ferritiinillä. Lisäksi tehdään entsyymileimauksia. (Colonel ym. 2006, 109–110, Immunosytokemia 2014, Niemi ym. 1995, 36–40.)

Värjäystapoja on kaksi: suora ja epäsuora immunosytokemiallinen värjäys. Suorassa menetelmässä primäärivasta-aine on leimattu. Tällöin värjäyskertoja tarvitaan vain yksi, mikä tekee menetelmästä nopean. Epäsuorassa menetelmässä näyte käsitellään ensin primäärivasta-aineella. Seuraavaksi se käsitellään leimatulla sekundaari vasta-aineella, joka tunnistaa primäärivasta-aineen. Se on siis sekundaarivasta-aineen antigeeni. Sekundaarivasta-aine tunnistaa primaarivasta-aineen vakio-osan (constant, c), joka on samanlainen kaikissa samassa eläimessä tuotetuissa, saman immunoglobuliiniluokan vasta-aineissa. Vasta-aineet pitää tuottaa eri eläimissä, koska esimerkiksi kani ei tuota kaniin vasta-aineelle vasta-ainetta. Eli tutkittavalle näytteelle voidaan tuottaa vasta-ainetta vaikka kanissa, tämä on primäärivasta-aine. Kun sitten tuotetaan esimerkiksi vuohessa vasta-aine kanille, saadaan sekundaarivasta-aine. Epäsuora menetelmä vie enemmän aikaa, mutta sillä saadaan suoraa menetelmää parempi reaktioherkkyys ja intensiivisempi värjäystulos. (Colonel ym. 2006, 109–110, Immunosytokemia 2014, Niemi ym. 1995, 36–40.) Kuvassa 3 nähdään suoran ja epäsuoran menetelmän vasta-ainesitoutuminen ja leiman sijainti näkyy keltaisena.



Kuva 3. Suora ja epäsuora immunosytokemiallinen värjäys (mukaillen Immunosytokemia 2014)

Tässä tutkimuksessa käytettiin epäsuoraa menetelmää. Värjäysten avulla haluttiin vertailla eri olosuhteiden vaikutusta ja solujen kypsyttä. Tätä tutkittiin analysoimalla toimivalle RPE-solulle tyypillisten proteiinien, MITF ja Bestrophin-1 sijaintia ja ilmentymistä immunovärjäysten avulla.

3 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Työn tavoitteena oli selvittää erilaistusliuoksessa käytetyn seerumin korvikkeen konsentraation optimaalinen pitoisuus RPE erilaistuksessa. Kasvatusliuoksessa käytetty seerumikorvike, KnockOut Serum Replacement (KO-SR, Gibco Invitrogen) on kallis reagenssi, joten sen määrän mahdollinen vähennys auttaisi pienentämään RPE-solujen ylläpitokustannuksia. Lisäksi toinen hyöty olisi erilaistuksen mahdollinen tehostaminen. Jatkoa varten mahdollisesta konsentraation vähennyksestä tulisi huomattavaa taloudellista hyötyä tutkimusryhmälle.

KO-SR-konsentraatio on nykyisessä kasvatusliuoksessa 15 %. Konsentraation merkitystä RPE-erilaistuksessa ei ole tutkimusryhmässä aiemmin tutkittu. Alun perin 15% KO-SR-konsentraatio on otettu käyttöön Klimanskaya ym. vuonna 2004 julkaiseman artikkelin pohjalta.

Työn tarkoituksena oli vertailla RPE-solujen erilaistumiskasvatusliuoksen (RPE DM-) KO-SR:n eri konsentraatioiden vaikutuksia soluihin. Työssä pyrittiin selvittämään, kuinka suuri seerumin korvikkeen prosentuaalinen osuus on tarpeen ja kuinka suuri merkitys pitoisuudella on solujen erilaistuksessa.

4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

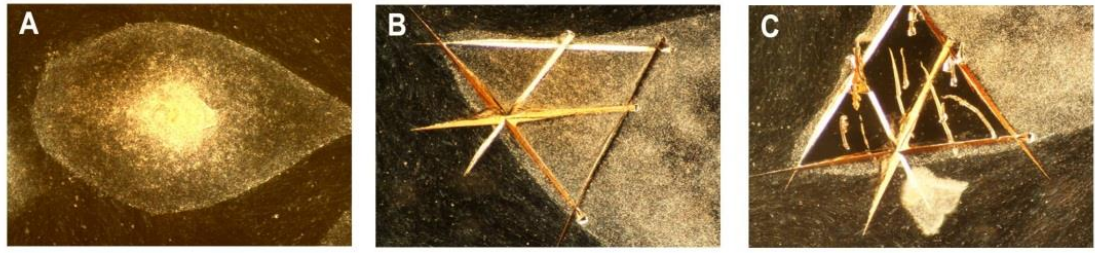
4.1 Solulinjat

Tutkimuksessa käytettiin kahta eri solulinjaa. Toinen oli yhteistyökumppanilta saatu Sendai iPS-linja, A116, ja toinen ryhmän pystyttämä alkion kantasolulinja Rega08/023. Ryhmän oma linja oli peräisin hedelmöityshoidossa ylijääneestä lahjoitusalkiosta. Molemmilla linjoilla tehtiin kaksi toistoa. Ensimmäisen erän solut otettiin analysoitavaksi aikapisteessä päivänä 77. Toisen erän soluista, joista osa otettiin analysoitavaksi aikapisteissä 43 ja 44, tutkittiin pigmentin määrää ja proteiinien ilmentymistä, kuten ensimmäisenkin erän soluista. Loput solut analysoitiin aikapisteissä 76 ja 77, jolloin tutkittiin lisäksi myös geenien ilmentymistä.

4.1.1 Soluviljely

Tutkimukseen tarvittiin ensimmäiseksi tutkittavat solut. Solut olivat ihmisen alkion kantasoluja ja indusoituja pluripotentteja kantasoluja. Ne saatiin solukolonioina ylläpitolaboratoriosta. Solukolonit kasvoivat tukisolukon päällä adherenttina.

Solukolonioista leikattiin skalpellin avulla erilaistumaton soluaines. Se valittiin koloniamorfologian mukaan. Leikattava alue erottui mikroskoopin avulla kolonioiden muodon ja selkeyden perusteella. Kuvasta 4 A voi nähdä erilaistumattoman ja erilaistuneen solukon eron. Leikatut palat irrotettiin varovasti injektioneulan avulla. Kuvassa 4 C näkyy irrotettu pala. Irrotettu soluaines siirrettiin pipetillä kuoppalevyjen kuoppiin. Solujen annettiin erilaistua spontaanisti erilaistumiskasvatusliuoksessa, jonka sisältö on kuvattu kappaleessa 4.1.2. Neljää eri KO-SR-konsentraatiota verrattiin keskenään optimaalisen pitoisuuden selvittämiseksi RPE-erilaistukselle. Soluja kasvatettiin 37 °C lämpötilassa inkubaattorissa.



Kuva 4. Erilaistukseen leikattavat solukolonioidit

Solut ruokittiin kolmesti viikossa. Solut siirrettiin inkubaattorista laminaarikaappiin ruokinnan ajaksi. Vanha kasvatusliuos imettiin pipetillä pois siten että, kuoppaan jäi suunnilleen puoli millilitraa vanhaa liuosta, ja uutta pipetoitiin tilalle kaksi millilitraa. Solujen annettiin erilaistua kunnes saatiin riittävä määrä pigmentoituneita soluja jatko-analyysia varten, kuitenkin vähintään kuukauden ajan.

4.1.2 Kasvatusliuokset

Vertailtavia konsentraatioita oli neljä. Silmälaboratorion tutkimusryhmällä käytössä oleva 15 %:n erilaistusliuos (DM-) toimi vertailukohtana uusille pienempi konsentraatioisille liuksille. Kasvatusliuokset sisälsivät Knockout Dulbecco's Modified Eagle's medium (KO-DMEM, Gibco), Nonessential amino acids 100x (NEAA, Lonza), Gluta-Maxi 100x (Gibco), Penicilin/Streptomycin 10000U/ml (p/s, Lonza), joka on antibioottiliuos, 2-mercaptoethanol 50mM (Gibco) ja seerumin vastinetta Knockout Dulbeccos's Serum Replacement (KO-SR, Gibco).

Taulukossa 1 näkyy liuksissa käytettyjen aineiden määrät. Tutkittavia reagensseja valmistettiin vain 50 ml, kun käytössä olevaa 15 % liosta valmistettiin 500 ml. Tämä siksi, että 15 % liuosta käytettiin muiden tutkimusten solujen kasvatukseen, joten sitä kului reilusti. Kasvatusliuosten säilyvyys jääkaapissa on vain kaksi viikkoa ja vertailussa olevia liuksia kului vähän, joten tutkittavia reagensseja tehtiin pienet määrät kerralla.

TAULUKKO 1. Kasvatuliuosten koostumukset

Liuos	15 %	10 %	5 %	1 %
KO-DMEM	411,5 ml	43,65 ml	46,15 ml	48,15 ml
NEAA	5,0 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
GlutaMax	5,0 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
p/s	2,5 ml	0,25 ml	0,25 ml	0,25 ml
b-mercaptoetanoli	1,0 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
KO-SR	75,0 ml	5,0 ml	2,5 ml	0,5 ml

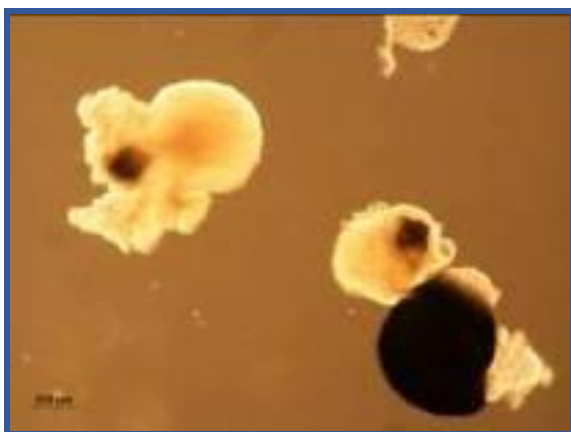
4.2 Mikroskopiointi

Solujen muotoa ja kypsyyttä seurattiin mikroskoopin avulla. Solumaljat tutkittiin kolme kertaa viikossa mikroskoopin avulla ruokintojen yhteydessä. Maljoja heiluttamalla saatiin soluaggregaatit kääntyilemään maljassa, jolloin voitiin tarkkailla niiden kehitystä tarkemmin. Soluaggregaattien kasvun huomasi ensimmäisenä, mutta tarkkailussa oli erityisesti pigmentin ilmestyminen.

Soluissa tarkkailtiin ensimmäisten pigmentoituneiden solujen ilmestymistä. Pigmentti-kohtien kokoa tarkkailtiin myös. Erityisesti vertailtiin vaikuttiko KO-SR-konsentraatio pigmentin ilmestymisnopeuteen ja määrään. Kasvatuksen lopuksi aikapisteissä 43 ja 44 pigmenttiä sisältäneiden soluaggregaattien määrä laskettiin joka kuopasta ja niiden koko arvioitiin sanallisesti.

4.3 Sytospin

Eri KO-SR-konsentraatioiden vaikutusta RPE-solujen määrään pyrittiin arvioimaan kvantitoimalla Bestrophin-1 ja MITF positiivisten solujen määrää immunosytokemiallisin värjäyksin. Tätä menetelmää varten solut spinnattiin mikroskooppilaseille sytospinlaitteen avulla. Sytospin-menetelmää varten solut täytyi saada yksisolususpensioksi. Kolmen testierän ensimmäisistä ja viimeisistä eristä tutkittiin vain pigmentoituneita soluja, mutta keskimmaisessa erässä tarkasteluun otettiin kaikki solut. Soluaggregaateista leikattiin mikroskoopin alla, skalpellin avulla, pigmentoituneet kohdat ja kerättiin ne erilleen vaaleasta solukosta puhtaisiin 24-kuoppalevyn kuoppiin. Kuvasta 5 nähdään pigmentoituneen ja vaalean solukon ero.



Kuva 5. Erilaistuneita soluaggregaatteja joissa näkyy myös pigmentoituneita alueita

Kun halutut solut oli eroteltu, keskimmaisessa erässä kaikki solut, ne pestiin kaksi kertaa PBS:llä. Pesun jälkeen kuoppiin lisättiin 200 µl trypsiiniä. Kuoppalevyt laitettiin inkubaattoriin 37 °C:een lämpötilaan, missä trypsiini hajotti soluaggregaatteja. Kuoppalevyt otettiin välissä pois ja kuoppien sisältöä purskuteltiin pipetin avulla. Inkubointia jatkettiin yhteensä noin 25 minuutin ajan. Mekaanista hajotusta jatkettiin purskutellen kunnes kuopissa ei ollut enää selkeitä suuria solupalleroita, vaan solut olivat toisistaan erillään. Seuraavaksi lisättiin 50 µl ihmisen seerumia (HS), joka lopetti trypsiinin vaikutuksen.

Solut suodatettiin 40 µm suodattimen läpi 15 ml:n koeputkiin. Kuopat ja suodatin huuhdeltiin vielä 100 µl PBS:ää, että saatiin mahdollisimman hyvin kaikki solut putkiin. Näytteet sentrifugoitiin 1000 rpm viiden minuutin ajan. Solut olivat nyt putkien pohjalla pellettinä ja nesteet imettiin mahdollisimman hyvin pois. Putkiin lisättiin PBS:ää. Määrä vaihteli eri kerroilla 200–500 µl:n välillä. Näytteistä pipetoitiin 10 µl:aa ruudutetulle solulaskuun tarkoitettulle lasilevyille ja päälle laitettiin peitinlasi. Näyteputket laitettiin jäähauteelle odottamaan.

Elävän ja ehjän näköiset solut laskettiin lasilta mikroskoopin avulla. Solumäärät olivat siis arvioita. Sytospin menetelmää varten tarvittiin 20000–25000 solua näytettä kohden ja näytteen tilavuus oli 150 µl. Solujen määrän ja näytetilavuuden laskussa oli kuitenkin käsityseroja, joten viimeiset, testin kaksi aikapisteen 76 ja 77, laskut tehtiin eri tavalla. Laskut löytyvät liitteestä 1. Laskujen jälkeen näytteet kuitenkin saatiin 150 µl:n tilavuuksiin laimentamalla niitä tarvittavilla tilavuuksilla PBS:ää. Seuraavaksi koottiin sentrifugointia varten niin kutsuttu spinnausvoileipä, jossa oli objektilasi, jonka päälle laitettiin halkaisijaltaan 16 mm:n peitinlasi. Näiden lasien päälle tuli vielä suodatin ja koko paketti laitettiin kammioon. Sitten tarkistettiin, että kammion aukko ja suodattimen aukko ovat kohdakkain ja peitinlasi on paikoillaan. Kammioihin pipetoitiin 150 µl näytettä ja kammiot laitettiin sentrifuugiin. Näytteitä sentrifugoitiin 600 rpm viiden minuutin ajan Low Accelerator asetuksella. Lopuksi voileivät purettiin ja peitinlasit siirrettiin pinsettien avulla 12-kuoppalevyille siten, että solupuoli oli ylöspäin. Solut fiksattiin 4 % paraformaldehydillä (PFA) välittömästi. PFA:n annettiin olla näytteissä vähintään 10 minuuttia, jonka jälkeen kuopat huuhdeltiin PBS:llä. Näytteisiin laitettiin 600 µl PBS:ää ja ne vietiin kylmiöön +4 °C lämpötilaan yön yli.

4.4 Immunosytokemialliset värjäykset

Ennen työn suoritusta valmistettiin tarvittavat liuokset. Ensimmäisenä valmistettiin 50ml 0,5 % BSA-PBS 10 %:sta. Määrät laskettiin yhtälöparina.

$$0,5\% \bullet 50ml = 10\% \bullet x$$

$$25 = 10x$$

$$2,5 = x$$

$$\longrightarrow 2,5ml \text{ } 10\% \text{ BSA ja } 47,5ml \text{ PBS}$$

Samanlaista yhtälöparia käyttäen valmistettiin myös 3 %:nen BSA-PBS. Triton X-100 laimennettiin myös 1xPBS:llä 4 %:sta 0,1 %:ksi. Lisäksi laimennettiin tarvittava määrä vasta-aineita. Käytetyt vasta-aineet löytyvät Taulukosta 2. MITF laimennettiin suhteessa 1:1000, Bestrophin-1 suhteessa 1:350 ja sekundaari vasta-aine anti-rabbit 1:1500. Laimennukseen käytettiin 0,5 %:sta BSA-PBS:ää. Jokaista näytettä kohden varattiin 600 µl vasta-aineseosta. Lisäksi värjäyksessä oli käytössä 1xPBS, jota käytettiin pesuihin.

Taulukko 2. Vasta-aineet

Primaari vasta-aine	Laimennos	Valmistaja
Rabbit polyclonal MITF	1:350	Abcam 59232
Rabbit polyclonal Bestrophin	1:1000	Abcam 14928
Sekundaari vasta-aine	Laimennos	Valmistaja
Anti-rabbit IgG 568	1:1500	Invitrogen, A11011

Yön yli inkuboituneet fiksatut näytteet pestiin 700 µl:lla PBS:ää kolme kertaa. PBS imettiin pois ja kuoppiin lisättiin 600 µl, solukalvot läpäiseviksi tekevää 0,1 %:sta Triton X-100-PBS:ää, jotta vasta-aine pääsee solun sisään. Sen annettiin olla huoneen lämmössä 10 min, jonka jälkeen näytteet pestiin kolme kertaa PBS:llä. Sitten lisättiin kuoppiin 600 µl 3 %:sta BSA-PBS-liuosta. Tällä blokattiin epäspesifistä sitoutumista. BSA-liuoksen annettiin vaikuttaa huoneen lämmössä tunnin ajan. BSA-liuos pipetoitiin pois ja tilalle pipetoitiin 600 µl primaarivasta-ainetta jonka annettiin inkuboitua huoneen lämmössä tunnin. Kuopat pestiin kolme kertaa PBS:llä ja tilalle pipetoitiin sekundaari vasta-ainetta 600 µl. Kuoppalevyt jätettiin huoneenlämpöön, mutta pimeään 1-1,5 tunniksi. Lopuksi solut pestiin kolme kertaa PBS:llä.

Näytteitä varten merkattiin objektilasit valmiiksi. Pipetillä laitettiin laseille 10 µl pisarat VECTASHIELD® HadSet™ Mounting Mediumia, jossa on tumat värjäävä DAPI- väri mukana. Juuri kuivahtaneet peitinlasit asetettiin pinsettien avulla niiden päälle solupinta objektilasin nestepintaa kohti. Näytteiden annettiin olla pöydällä 15 minuutin ajan, jonka jälkeen ne siirrettiin kylmiöön +4 °C lämpötilaan säilytykseen. Solut tutkittiin ja kuvattiin myöhemmin fluoresenssimikroskoopin avulla. Havainnot ja lasketut solumäärät kirjattiin ylös ja taulukoitiin.

4.5 RT-PCR

4.5.1 RNA eristys

Lisäksi haluttiin tutkia RPE:lle tyypillisten geenien ilmentymistä RT-PCR-menetelmällä. Viimeisen testierän suspensoiduista soluista vain A116-linjan soluja oli riittävästi sytospin näytteenoton jälkeen. Näytteitä oli neljä, yksi jokaista tutkittua konsentraatio-olosuhdetta kohden. Suspensiot siirrettiin koeputkiin, ja putket laitettiin sentrifuugiin. Fuugauksen jälkeen pinnalle jäänyt neste imettiin pipetillä pois ja putkiin lisättiin 100 µl RA1-liuosta, lyysipuskuria, joka hajottaa solut. Näytteet vietiin säilytykseen syväjäähdytyskammioon -70 °C lämpötilaan. Varsinainen RNA-eristys tehtiin myöhemmin.

Eristykseen käytettiin NucleoSpin® RN XS-kittiä (Macherey Nacel). Aluksi valmistettiin eristyksessä tarvittavat liuokset. Ensimmäinen oli RNA carrier working solution. Carrier RNA liuoksesta tehtiin 1:100 laimennos, 1 µl 99 µl:aan RA1-liuosta. Toinen liuos oli rDNase reaction mixture. Siihen tuli 3 µl rDNase-liuosta ja 27 µl Reaction buffer for rDNase-liuosta jokaista näytettä kohden. Näytteet sulatettiin ja niihin lisättiin 2 µl TCEP:iä.

Näytteisiin lisättiin 5 µl Carrier RNA working-liuosta ja näytteet sekoitettiin vortexilla ja sentrifugoitiin 1 s 1000 rpm. Koska näytteissä oli vähän soluja, jätettiin välisuodatus tekemättä. Putkiin lisättiin 100 µl 70 %:sta etanolia ja liuokset pipetoitiin ylös alas viisi kertaa. Liuokset siirrettiin suodattimellisiin putkiin ja sentrifugoitiin 30 s 11000 rpm. Seuraavaksi siirrettiin suodattimet uusiin putkiin ja lisättiin 100 µl MBD:tä. Putket sentrifugoitiin 30 s 11000 rpm. Suodattimiin lisättiin 25 µl DNase reaction mixture-liuosta ja putkia inkuboitiin 15 minuuttia huoneen lämmössä. Inkuboinnin jälkeen suodattimiin lisättiin 100 µl RA2-liuosta ja inkuboitiin kaksi minuuttia huoneen lämmössä.

Seuraavaksi putket sentrifugoitiin 30 s 11000 rpm. Suodattimet siirrettiin uusin putkiin ja lisättiin 400 µl RA3-liuosta. Taas putket sentrifugoitiin 30 s 11000 rpm. Tämän jälkeen pukista kaadettiin nesteet pois ja suodattimet asetettiin takaisin. Putkiin lisättiin 200 µl RA3-liuosta, jonka jälkeen sentrifugoitiin 2 min 11000 rpm. Suodattimet siirrettiin puhtaisiin 1,5 ml putkiin ja niihin lisättiin steriiliä vettä 10 µl. Näytteet sentrifugoitiin 30 s 11000 rpm ja suodattimet heitettiin pois. Putket suljettiin ja siirrettiin pikaisesti jäähauteeseen ettei RNA hajoa. Viimeisenä näytteiden RNA-pitoisuudet mitattiin Nano-Drop-spektrofotometrillä. Tulostaulukko liitteessä 3.

4.5.2 cDNA kääntö

RNA-näytteet käännettiin cDNA-muotoon PCR-ajoa varten. Synteesissä käytettiin kaupallista Applied Biosystems High Capacity cDNA Reverse Transkription- kittiä. Tavoiteltu RNA-pitoisuus oli 50 ng:aa 20 µl:n reaktiossa. Koska mitatut RNA-pitoisuudet olivat häviävän pienet, käytettiin kääntöön näytteiden koko tilavuutta. Tarvittavat reagenssit sulatettiin ja valmistettiin mastermix. Neljän näytteen lisäksi otettiin myös kontrollinäyte ja huomioitiin pipetointivara. Taulukossa 3 näkyy käytetyt reagenssit ja niiden määrät.

Taulukko 3. cDNA käännön mastermix pipetointikaavio

Reagenssi	v	6x
10x RT Buffer	2,0 µl	12,0 µl
25x dNTP Mix (100mM)	0,8 µl	4,8 µl
10x RT Random Primers	2,0 µl	12,0 µl
MultiScribe [®] Reverse Transcriptase	1,0 µl	6,0 µl
RNase Inhibitor	1,0 µl	6,0 µl
Nucleoase free H ₂ O	3,2 µl	19,2 µl
total	10 µl	60,0 µl

Pipetoitiin mastermixiä 10 µl putkiin. Seuraavaksi pipetoitiin RNA-näytettä 10 µl jokaiseen putkeen sekoittaen kahdesti ylös alas pipetoimalla. Putket suljettiin ja sentrifugoitiin niin, että saatiin neste putkien pohjalle. Putket säilytettiin jäähauteessa kunnes ne laitettiin kääntöön.

4.5.3 PCR-reaktio

Koska vain viimeiseen testierän toisesta solulinjasta saatiin eristettyä RNA, ei myöskään PCR-ajoja voitu tehdä muilla kerroilla. Näytteitä oli neljä ja lisäksi kontrollinäyte. Tutkittavat geenit olivat Mitf, RPE65, Bestrophin-1, Tyrosinase ja sisäisenä referenssinä GAPDH. Mastermiksejä tehtiin siis viisi erillistä omiin eppendorf-putkiinsa. Ne tehtiin taulukon 4 mukaan. Ensimmäisenä taulukossa näkyy käytetyt reagenssit. Seuraavissa sarakkeissa on mastermiksin tilavuus yhdelle näytteelle, sitten seitsemänkertainen tilavuus, vaikka näytteitä on vain viisi, koska siinä on huomioitu pipetointivara ja mahdollisen virheen varalta ylimäärä.

Taulukko 4. PCR-ajon mastermiks pipetointikaavio

Reagenssi	v	7x	Lopullinen c
H ₂ O	16,6 µl	116,4 µl	1x 1,5 mM 0,1 mM 0,2 µM 0,2 µM 0,6 U
10x buffer -Mg ²⁺ + KCL	2,5 µl	17,5 µl	
MgCl 25 mM	1,5 µl	10,5 µl	
dNTP 2 mM	1,25 µl	8,8 µl	
primer -F 5 µM	1,0 µl	7,0 µl	
primer -R 5 µM	1,0 µl	7,0 µl	
Taq polymerase	0,125 µl	0,9 µl	
total	24,0 µl	168,0 µl	

Valmistetut mastermiksit pipetoitiin, kaikki geenit omille erillisille, PCR-laitteeseen sopiville liuskoille. Jokaiseen kuoppaan pipetoitiin myös näytettä 1 µl järjestyksessä 1 %, 5 %, 10 %, 15 % ja kontrolli (knt). Kaikki liuskat laitettiin samaan ajoon, joka tehtiin gradienttiajona, jossa annealing-lämpötilat vaihtuivat välillä 51–55,2 °C. Liuskat olivat seuraavilla paikoilla ja kullekin geenille spesifinen annealing-lämpötila oli seuraava:

4. 51,8 °C=Mitf, 5. 52,2 °C=TYR, 6. 52,7 °C=RPE65, 11. 54,9 °C BEST ja 12. 55,1 °C=GAPDH. Jokainen geeni oli asetettu mahdollisimman lähelle omaa optimaalista lämpötilaansa. Ajo aloitettiin hot-startilla.

PCR-ajon aikana valmistettiin geelit geeliajoa varten. Erlenmayeriin punnittiin 2 g agarosia ja 100 ml:aa 1xTBE:tä. Ne sekoitettiin mahdollisimman hyvin ja lämmitettiin mikroaaltouunissa, kunnes seos oli tasaista ja kirkasta. Sen jälkeen seos jäähdytettiin ja kun sen lämpötila oli enää noin 60 °C, siihen lisättiin 5,5 µl etidiumbromidia, sekoitettiin ja kaadettiin geelikelkkaan. Geeliin lisättiin kampa ja se jätettiin jähmettymään. Geelejä valmistettiin kaksi.

Kun PCR-ajo oli valmis ja geelit jähmettyneitä, valmisteltiin näytteet geeliajoon. Ensimmäisenä valmistettiin gene ruler-liuos. Liuos tehtiin nelinkertaisena. Pipetoitavat määrät löytyvät taulukosta 5.

Taulukko 5. Gene ruler-liuos

Liuos	v	4x
DNA ladder (50 bp)	6,0 µl	24,0 µl
6x loading dye	4,0 µl	16,0 µl
H ₂ O	14,0 µl	56,0 µl

PCR-näytteisiin lisättiin 5 µl 6x loading dyeta. Näytteet ja standardit (gene ruler) pipetoitiin kahteen geeliin taulukon 6 mukaan. Ajon jälkeen geelit kuvattiin.

Taulukko 6. Pipetointikaavio geeliajolle

MITF						RPE 65						TYR						
st	1	5	10	15	knt		1	5	10	15	knt		1	5	10	15	knt	st
BEST						GAPDH												
	st	1	5	10	15	knt					1	5	10	15	knt		st	

5 TULOKSET

5.1 Erilaistuksen tehokkuuden arviointi

RPE-erilaistumisen etenemistä seurattiin päivittäin, pois lukien viikonloput, mikroskoopin avulla. Soluista tarkkailtiin ensimmäisten pigmentoituneiden kohtien ilmestymistä eri olosuhteissa. Nämä nähdään taulukossa 7, jossa taulukon osa A kertoo solulinja Regea08/023:n ensimmäiset päivät, jolloin pigmenttiä havaittiin ja taulukon osa B kertoo solulinjan A116 huomiot. Keskimäärin ei ollut suurta eroa eri KO-SR-konsentraatioiden välillä ensimmäisissä pigmenttihavainnoissa. Lisäksi pigmentoituneiden alueiden osuutta laskettiin silmämääräisesti arvioiden testin 2 niistä soluaggregaateista, jotka otettiin testaukseen ilman valikointia loppuaikapisteissä päivinä 44 ja 43. Taulukossa 8 nähdään soluaggregaattien määrä ja niissä olleiden pigmentoituneiden alueiden määrä. Soluaggregaatit olivat erikokoisia samoin kuin pigmentoituneet alueet. Silmämääräisesti olosuhteet sekä 10 %:ssa että 15 %:ssa liuoksissa olivat yhtä vahvat ja 1 %:ssa ja 5 %:ssa edellä mainittuja selvästi heikommat. Kuvassa 6 nähdään toisen erän kuoppalevyt aikapisteissä 76 ja 77. Kuoppalevyyn on myös kirjoitettu jokaisen kuopan ensimmäiset päivät, jolloin pigmenttiä havaittiin. Regea08/023 linjan kuoppalevyssä on kahdet päivät, koska siinä on kaksi kuoppalevyä yhdistettynä. Solulinjan A116 oli pigmentoitumisen suhteen selvästi vahvempi.

Taulukko 7. Ensimmäiset pigmenttihavainnot

A	ensimmäiset pigmentoituneet solut havaittu päivänä (d)				
08/023	1. testi	2. testi, 1	2. testi, 2	2. testi, yhdistetty	keskiarvo
1 %	12	20	21	20	18
5 %	12	17	23	20	18
10 %	12	22	19	15	17
15 %	16	20	14	20	18

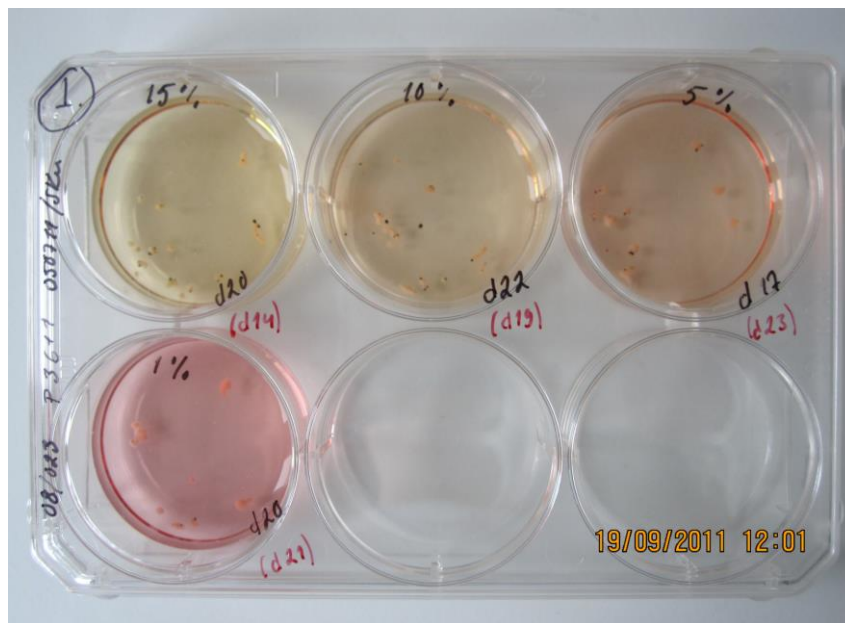
B	ensimmäiset pigmentoituneet solut havaittu päivänä (d)			
A116	1. testi	2. testi, 1	2. testi, yhdistetty	keskiarvo
1 %	16	23	23	21
5 %	14	26	23	21
10 %	16	26	23	22
15 %	21	26	23	23

Taulukko 8. Pigmenttiä sisältäneiden soluagregaattien määrä päivinä 43 ja 44

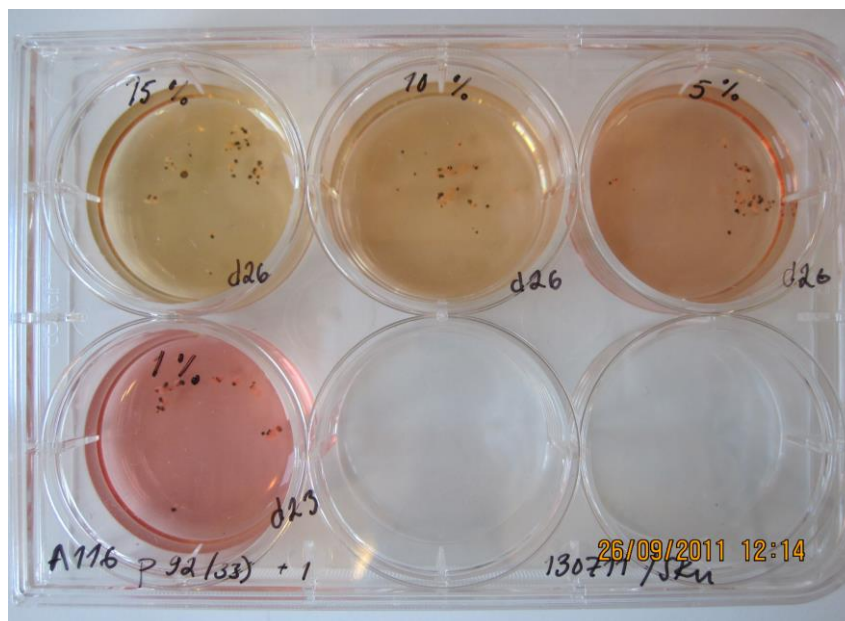
A	08/023 (d44)	soluaregaattien lukumäärä	pigmentoituneet alueet	Prosentuaalinen määrä
	1 %	22	4	18 %
	5 %	20	4	20 %
	10 %	19	13	68 %
	15 %	19	11	59 %

B	A116 (d43)	soluaregaattien lukumäärä	pigmentoituneet alueet	Prosentuaalinen määrä
	1 %	20	8	40 %
	5 %	25	15	60 %
	10 %	25	19	76 %
	15 %	30	19	63 %

A



B



Kuva 6. Testierä 2:n kuoppalevyt loppuaikapisteessä

5.2 Erilaistumisen ja kypsyyden arviointi

5.2.1 Solujen erilaistuminen ja morfologia

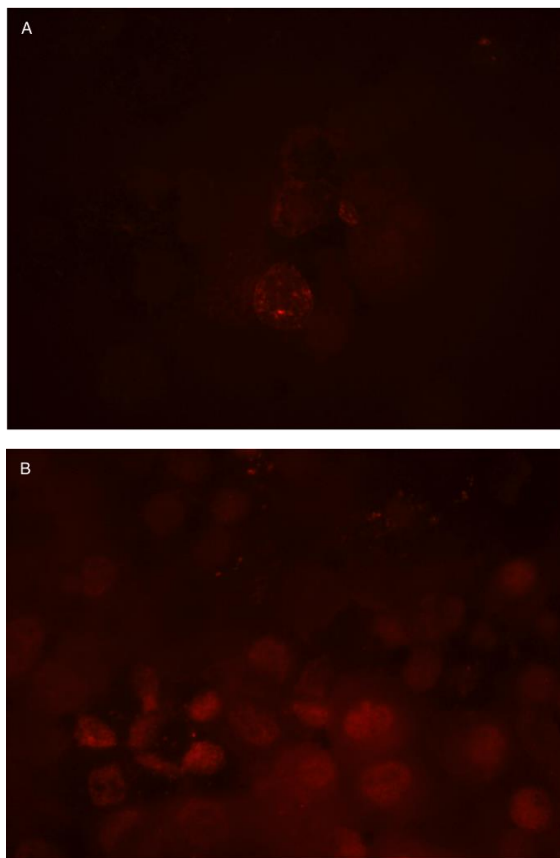
Liitteessä 2 on kirjattuna kaikki immunosytovärjäyksistä fluoresenssimikroskoopilla otetuista kuvista tehdyt havainnot eri aikapisteiden näytteistä. Solut on laskettu kuvista ja samoin solut, jotka ilmentävät tutkittuja proteiineja MITF ja Bestrophin-1. Taulukossa 9 nähdään tutkittujen proteiineja ilmentävien solujen määrä. Tulosten perusteella ei voida suoraan sanoa, mikä konsentraatio olisi erilaistumisen kannalta paras, mutta 1 %:n liuoksen näytteet ilmentävät proteiineja selvästi huonoiten.

Taukko 9. MITF ja Bestrophin-1 proteiineja ilmentävien solujen määrä ja prosentuaalinen osuus

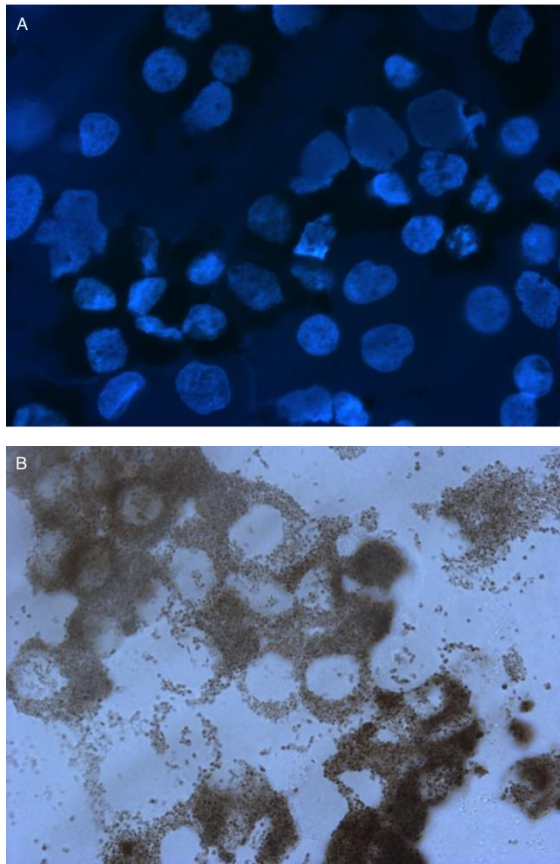
A	08/023	1 %	%	5 %	%	10 %	%	15 %	%	HUOM
Testi 1										yksi näyte jokaista
Bestrophin-1	12	13 %	39	15 %	15	4,5 %	36	15 %		5% lisänä myös 1%
MITF	x		x		x		x			ei näytettä, x
Testi 2 (kaikki solut)										kaksi näytettä jokaista
Bestrophin-1	0	0 %	0	0 %	0	0 %	0	0 %		
MITF	0	0 %	9	2,6 %	2	0,6 %	2	0,8 %		1% ja 15% vain yksi näyte
Testi 3										
Bestrophin-1	0	0 %	2	1,1 %	0	0 %	3	1,2 %		yksi näyte jokaista
MITF	x		5	3,0 %	19	9,6 %	8	3,6 %		ei näytettä, x

B	A116	1 %	%	5 %	%	10 %	%	15 %	%	HUOM
Testi 1										yksi näyte jokaista
Bestrophin-1	5	4,2 %	0	0 %	3	4,4 %	1	0,7 %		
MITF	10	3,7 %	0	0 %	10	4,0 %	0	0 %		
Testi 2 (kaikki solut)										kaksi näytettä jokaista
Bestrophin-1	0	0 %	0	0 %	0	0 %	0	0 %		
MITF	0	0 %	0	0 %	0	0 %	0	0 %		
Testi 3										
Bestrophin-1	0	0 %	2	0,8 %	1	0,4 %	3	1,1 %		yksi näyte jokaista
MITF	4	2,2 %	1	0,4 %	25	10 %	8	4,0 %		

Kuvassa 7 A on linjan A116 10 %:nen Bestrophin-1-näyte ja B on linjan A116 10 %:nen MITF-näyte kuvattuna fluoresenssimikroskoopilla. Näytteissä oli taustavärjäytyvyyttä, joten suurin osa kuvista ei ollut yhtä helposti tulkittavia kuin kuva 7. Kuvassa 7 A näkyviä hohtavia pisteitä oli monissa kuvissa havaittavissa vain muutamia, joten ne katsottiin negatiivisiksi tuloksiksi. Kuvassa 8 A nähdään yksi linjan A116 10 %:sta näytteistä otettu DAPI kuva. Siinä tumat ovat turkoosit ja melaniinipigmentti näkyy tummina jyväsinä. Kuvassa 8 B on yksi linjan A116 10 %:sta näytteistä otettu kirkas-kenttäkuva, jossa melaniinipigmentti näkyy ruskeina tai mustina jyväsinä.



Kuva 7. Immunosytokemialliset värjäykset, Bestrophin-1 ja MITF



Kuva 8. Immunocytokemialliset värjäykset, DAPI ja kirkaskenttä

Taulukko 10. Pigmenttimäärä

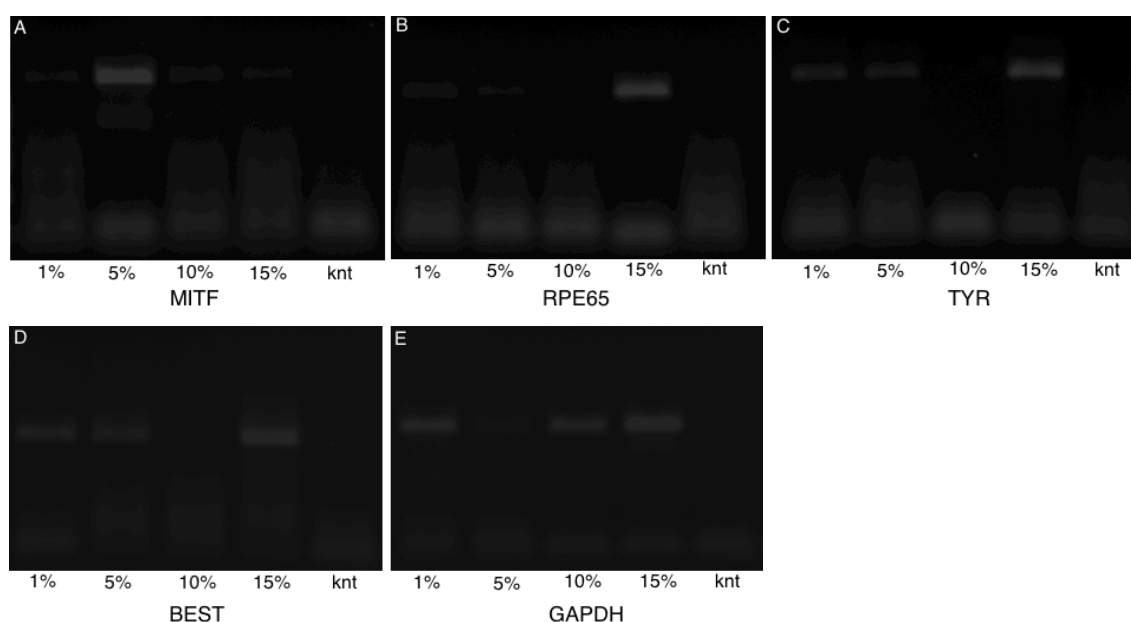
A 08/023				B A116			
Testi 1	DAPI	Pigmentti	%-osuus	Testi 1	DAPI	Pigmentti	%-osuus
1 %	91	22	24	1 %	389	169	43
5 %	267	129	48	5 %	365	136	37
10 %	330	152	46	10 %	316	187	59
15 %	210	143	68	15 %	323	127	39
Testi 2				Testi 2			
1 %	366	5	1,4	1 %	1317	101	7,7
5 %	709	9	1,3	5 %	1154	65	5,6
10 %	594	30	5,1	10 %	1079	111	10
15 %	768	22	2,9	15 %	1129	100	8,9
Testi 3				Testi 3			
1 %	278	153	55	1 %	415	320	78
5 %	346	276	80	5 %	465	319	69
10 %	402	322	80	10 %	521	347	67
15 %	483	327	68	15 %	477	336	70

Kaikista olemassa olevista näytteistä otettiin useampia kuvia. Jokaisesta kohdasta otettiin sekä immunoleiman näyttävä kuva, tumien määrän kertova DAPI-kuva että melaniinipigmentin näyttävä kirkaskenttäkuva. Kuvien perusteella arvioitiin solujen morfologiaa. Se oli erilaistetuilla soluilla RPE-solujen kaltainen. Solut muistuttivat muodoltaan autenttisia, mukulakivimäisiä RPE-soluja. DAPI-kuvista laskettiin kokonaissolumäärä ja bright field kuvista melaniinipigmenttiä sisältävien solujen määrä. Taulukossa

10 näkyy, paljonko soluja laskettiin ja montako niistä oli pigmentoitunut. Lisäksi viimeiseksi on laskettu pigmentoituneiden solujen prosenttiosuus. Eri näytteistä on otettu eri määrät kuvia, joten solumäärät eivät ole suoraan verrannollisia toisiinsa nähden. Prosenttiosuuksia taas voidaan verrata toisiinsa. Tulosten perusteella voidaan todeta, että kaikissa olosuhteissa löytyi pigmentoituneita soluja. Vaikka silmämääräisesti näytti siltä, että 10 % ja 15 % konsentraatioissa kasvaneissa soluissa oli selvästi eniten pigmenttiä, eivät erot analysoiduissa soluissa olekaan kovin suuret tai johdonmukaiset.

5.2.2 Geenien ilmentyminen

Näytteistä eristetyn RNA:n konsentraatio oli hyvin pieni. RNA:n kääntöön komplementaariseksi DNA:ksi olisi käytettyyn menetelmään tarvittu suurempi RNA-pitoisuus hyvän tuloksen takaamiseksi, mutta työ päätettiin silti tehdä sillä materiaalilla mitä oli käytettävissä. Mitatut RNA-pitoisuudet löytyvät liitteestä 3. Geenit, joita eri olosuhteet ilmensivät näkyvät kuvassa 9.



Kuva 9. RT-PCR:n jälkeen ajetut geelit

Kuvan valoisuutta jouduttiin lisäämään, että saatiin heikoimmatkin juovat havaittua. 10 %:sta näytteestä ei löytynyt RPE65:stä, TYR:a eikä Bestrophin-1:stä. Koska 10 %:ssa näytteessä oli myös huomattavasti pienempi RNA-konsentraatio kuin muissa näytteissä, ei tulosten luotettavuudesta ole varmuutta. MITF-geeniä lukuun ottamatta, 15 %:nen näyte vaikuttaisi ilmentävän tutkittuja proteiineja kaikkein vahvimmin.

POHDINTA

Tutkimuksella pyrittiin selvittämään, voidaanko spontaanissa erilaistuksessa käytetyn kasvatusliuoksen KO-SR-konsentraatiota vähentää. Tutkittiin kuinka se vaikuttaa RPE-erilaistukseen. Vertailussa olleiden 1, 5, 10 ja 15 %:sten liuosten vaikutusta tarkkailtiin silmämääräisesti solujen kasvatuksen aikana ja lopuksi kypsiä solua karakterisoitiin eri menetelmin.

Soluja arvioitiin silmämääräisesti. Niistä tutkittiin melaniinipigmentin määrää ja sen ensimmäistä ilmentymistä eri olosuhteissa. Solujen silmämääräisen arvioinnin perusteella 10 ja 15 %:set konsentraatiot tuottivat yhtä paljon pigmentoitunutta solukkoa. Myöskään ensimmäisissä pigmenttihavainnoissa ei ollut juuri eroa. Pienemmät pitoisuudet olivat selvästi heikompia.

Solujen karakterisointia varten soluaggregaatit piti saada yksisolususpensioksi. Solujen lyysaus yksisolususpensioksi sytospiniä varten oli työvaiheena haastava. Erityisesti loppuaikapisteiden, päivät 43 ja 44, kohdalla tehdyt analyysit tuottivat vaikeuksia. Tutkittavaksi otettiin koko solupopulaatio, eikä valikoitu pelkkiä pigmentoituneita soluja. Tämä aiheutti vaikeuksia siksi, että vaalea solukko hajosi yksittäisiksi soluiksi paljon nopeammin kuin pigmentoitunut solukko. Ja koska ei haluttu, että solutkin hajoavat, jouduttiin tekemään kompromissi trypsiinin vaikutusajan suhteen ja lopettamaan se ennen kuin kaikki tumma solukko saatiin kunnolla eroteltua. Tämä puolestaan johti siihen, että osa pigmentoituneista soluista jäi suodattimeen, eikä päätenyt tutkittavaan näytteeseen. Näin ollen näytteissä suuri osa oli vaaleita, pigmentoitumattomia soluja. Tämä vaikutti olennaisesti myös myöhemmin tehtävien immunosytokemiallisten värjäysten tuloksiin.

Immunosytokemiallisten värjäysten avulla tutkittiin ilmentävätkö solut RPE-soluille tyypillisiä proteiineja MITF ja Bestrophin-1. Loppuaikapisteiden 43 ja 44 näytteiden proteiinien ilmentyminen oli hyvin heikkoa. Vain muutamia yksittäisiä positiivisia tuloksia havaittiin, vaikka soluja oli paljon. Tämä voi kertoa siitä, että solut eivät olleet vielä kypsiä, tai siitä että liian suuri osa pigmentoituneista soluista suodattui aikaisemmin pois. Myös viimeisen vaiheen, loppuaikapisteiden 76 ja 77, positiivisten tulosten määrä oli vähäinen. Tässä puolestaan puutteelliset solulaskut ja niistä aiheutuneet vähäiset solumäärät saattoivat aiheuttaa tuloksen. MITF-positiivisia soluja kuitenkin löytyi

kaikissa olosuhteissa, joten voidaan päätellä, että erilaistus oli kuitenkin onnistunut. Ensimmäisen erän, loppuaikapisteen 77, A116 tulos oli heikko, mutta MITF ilmeni kuitenkin 1 ja 10 %:sten konsentraatioiden näytteissä. Regea08/023-linjan solut ilmensivät hyvin Bestrophin-1 proteiinia. Linjan Regea08/023 soluja oli kuitenkin niin vähän, ettei MITF-näytteitä saatu. Solujen vähyys osoittautuikin suurimmaksi rajoittavaksi tekijäksi eri analyyseille. Jatkoa ajatellen suuremmat solumäärät takaisivat varmasti luotettavampia ja selkeämpiä tuloksia.

Proteiinien ilmentymisen lisäksi arvioitiin solujen ulkomuotoa. Erilaistetut solut näyttivät morfologialtaan autenttisilta RPE-soluilta. Lisäksi tutkittiin ilmentävätkö erilaistetut solut RPE-soluille tyypillisiä geenejä. Koska viimeiset sytospinia varten tehdyt solulas-
kut olivat puutteelliset, oli käytössä ollut RNA:n määrä niin pieni, että se saattoi vaikuttaa myös geenien ilmentymiseen. Geelissä näkyi selvästi vain 15 %:n näytteen juovat. Geenit olisivat saattaneet näkyä geelissä voimakkaampina, jos tutkittavaa materiaalia olisi ollut riittävästi. Erityisesti 10 %:n olosuhteen tulosten luotettavuudesta ei ole varmuutta. Näin ollen kahden vahvimman konsentraation, 10 %:n ja 15 %:n, vertailu on hankalaa. 10 %:n olosuhdetta lukuun ottamatta kaikki olosuhteet kuitenkin antoivat positiiviset tulokset kaikille tutkituille geeneille. Juovat olivat hyvin heikot, mutta jos soluja olisi ollut riittävästi, tulos olisi voinut olla paljon selkeämpi ja luotettavampi.

Saadut tulokset eivät olleet yksiselitteisiä tai selkeitä. Niiden perusteella kuitenkin voidaan sanoa että olosuhteet 10 %:n ja 15 %:n liuoksissa olivat RPE-erilaistuksen kannalta vahvimpia. Ei voida siis sanoa että 15 %:sen liuoksen voi vaihtaa 10 %:seen liuokseen, vaan olosuhteiden vaikutus vaatii lisää tutkimusta. Lopullinen, optimaalinen KO-SR-prosenttiosuus saattaisi olla myös jotain 10 ja 15 välillä. Jatkotutkimuksissa voitaisiin vertailla 10 ja 15 prosenttisten pitoisuuksien lisäksi esimerkiksi 12 tai 13 prosenttisia pitoisuuksia.

Solujen erilaistumista RPE-solujen kaltaisiksi soluiksi voidaan arvioida myös muilla tavoilla. RPE-markkereita voidaan havaita myös muiden menetelmien avulla, kuten reaaliaikaisen kvantitatiivisen PCR:n ja Western blottingin avulla (Klimanskaya 2006). Soluille voidaan tehdä myös toiminnallisia testejä. Niissä testataan RPE-soluille tärkeitä fagosytoivia ominaisuuksia. (Klimanskaya 2006.) Jatkotutkimuksissa olisikin hyvä vertailla eri olosuhteiden tuotoksia myös muiden menetelmien avulla.

LÄHTEET

BioMediTech. 2014. Päivitetty 23.4.12. Luettu 24.10.2014

<http://www.uta.fi/bmt/institute/research/miettinen/indexfi.html>.

Bongso, A. & Lee, Eng Hin. 2005. Stem Cells: Their Definition, Classification and Sources. Teoksessa Bongso, A. & Lee, Eng Hin. (ed.) Stem Cells From Bench to Bed-side. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. 1–14.

Campbell, M. & Farrell, S. 2008. Biochemistry. 6. painos. Belmont, CA: Brooks/Cole, Cengage Learning.

Carr, A., Smart, M., Ramsden, C., Powner, M., Cruz, L. & Coffey, P. 2013. Development of human embryonic stem cell therapies for age related macular degeneration. Cell press. Jul:37 (7): 385–395.

Colonel, D., Learmonth, S. & Braham-Thompson, A. 2006. Immunologic Detection of Infectious Diseases. Teoksessa Mahon, C. & Tice, D. Clinical Laboratory Immunology. New Jersey: Pearson Prentice Hall, 103–110.

Embryonic stem cells, Stem Cell Basics, National institute of health. 2014. Päivitetty 2002. Luettu 22.10.2014

<http://stemcells.nih.gov/info/basics/pages/basics3.aspx>.

Genetics Home Reference 1. 2014. Päivitetty 4.10.2014. Luettu 6.10.2014

<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/BEST1>.

Genetics Home Reference 2. 2014. Päivitetty 4.10.2014. Luettu 6.10.2014

<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/MITF>.

Genetics Home Reference 3. 2014. Päivitetty 4.10.2014. Luettu 6.10.2014

<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/RPE65>.

Genetics Home Reference 4. 2014. Päivitetty 4.10.2014. Luettu 6.10.2014

<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/TYR>.

Hovatta, O., Mikkola, M., Gertow, K., Strömberg, A., Inzunza, J., Hreinsson, J., Rozell B., Blennow, E., Andäng, M. & Ahrlund-Richter, L. 2003. A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells. Human Reproduction. Jul; 18 (7): 1404–1409.

Immonen, I., Kivelä, T. & Saari, K.M. 2011. Verkkokalvo ja sen sairaudet. Teoksessa Saari, K.M. Silmätautioppi. 6. uudistettu painos. Helsinki: Kandidaattikustannus, 231–262.

Immunosytokemia, Solunetti. 2014. Päivitetty 2006. Luettu 31.10.2014

<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/immunosytokemia/2/>.

Induced pluripotent stem cells, Stem Cell Basics, National institute of health. 2014. Päivitetty 2002. Luettu 24.10.2014

<http://stemcells.nih.gov/info/basics/pages/basics10.aspx>.

Introduction, Stem Cell Basics, National institute of health. 2014. Päivitetty 2002. Luettu 20.10.2014

<http://stemcells.nih.gov/info/basics/pages/basics1.aspx>.

Kaarniranta, K., Seitsonen, S., Paimela, T., Meri, S. & Immonen, I. 2009. Silmäpohjan ikärappeuman patogeneesi. *Duodesim*. Jul: 125 (2): 145-53.

Kaarniranta, K., Sihvola, R., Salminen, A., Lammi, M., Teräsvirta, M. & Kontkanen, M. 2003. Silmäpohjan ikärappeuma – vaikea ongelma sekä potilaalle että silmälääkärille. *Duodesim*. Jul: 119 (10): 935-942.

Kantasolut, Solunetti. 2014. Päivitetty 2006. Luettu 22.10.2014

<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/kantasolut/2/>.

Kivelä, T. 2011. Silmän rakenne ja toiminta. Teoksesta Saari, K.M. Silmätautioppi. 6. uudistettu painos. Helsinki: Kandidaattikustannus, 11–36.

Klimanskaya, I. 2006. Retinal Pigment Epithelium. *Methods in Enzymology*. Jul: 418: 169–194.

Life Technologies. 2014. Luettu 3.10.2014

<http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/10828028>.

Niemi, M., Virtanen, I. & Vuorio, E. 1995. Solu- ja moleekyylibiologia. 6. painos. Porvoo: WSOY. 36–40.

Nienstedt, W., Hänninen, O., Arstila A. & Björkqvist S. 2004. Ihmisen fysiologia ja anatomia. 15. uudistettu painos. Porvoo: WSOY, 502–504.

Retina Associates. 2014. Luettu 29.10.2014

<http://www.sneretina.com/retinal-diseases-and-treatments/>.

Rowland, T., Bucholz, D., Clegg, D. 2012. Pluripotent Human Stem Cells for the Treatment of Retinal Disease. *Cellular Physiology*. Jul: 227: 456–466.

Strauss, O. 2005. The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function. *Physiological reviews*. Jul: 85 (3): 845–881.

Thomson, J., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S., Waknitz, M., Swiergiel, J., Marshall, V., Jones, J. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. Jul: 282: 1145–1147.

Vaajasaari, H., Ilmarinen, T., Juuti-Uusitalo, K., Rajala, K., Onnela, N., Narkilahti, S., Suuronen, R., Hyttinen, J., Uusitalo, H., Skottman, H. 2011. Toward the defined and xeno-free differentiation of functional human pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelial cells. *Molecular vision*. Jul: 17:558–575.

Välimäki, J. 2012. Näkö takaisin verkkokalvoistutteella. *Duodecim*. Jul: 128 (11): 1140-4.

LIITTEET

1(3)

Liite 1. Sytospinlaskut

Hajotetut solut laskettiin, että saatiin pipetointimäärät selville. Taulukossa 11 on kaikkien testien lasketut tulokset. Tulokset ovat keskiarvoja useamman henkilön saamista tuloksista.

Taulukko 11. Sytospiniä varten lasketut solumäärät

keskiarvo laskettujen solujen määrästä				
testi 1 d77	1 %	5 %	10 %	15 %
08/023	6	16	24	25
A116	24,6	23	14	21,25
testi 2 d43 ja 44				
08/023 (d44)	231,5	189	50	82,5
A116 (d43)	317	191	159	213
testi 2 d76 ja 77				
08/023 (d77)	13	24	24	31
A116	57	45	36	53

Testien 1 ja 2 (d43 ja d44) pipetointimäärät laskettiin tavalla 1 seuraavasti:

$$\text{lasketut solut} \cdot 10^4 \cdot \left(\frac{\text{näytetilavuus}}{\text{haluttu tilavuus}} \right) = \text{solua/ml}$$

$$\frac{\text{haluttu solumäärä}}{\text{solua/ml}} = \text{pipetoitava tilavuus}$$

Sytospinlaskut

Testissä 1 näytetilavuus oli 500 µl A116 ja 200 µl 08/023, ja haluttu tilavuus oli 1 ml, koska tulos haluttiin muotoon solua/ml. Haluttu solumäärä oli 20000. Soluja ei aina ollut riittävästi, joten tyydyttiin siihen määrään joka oli käytettävissä. Esimerkkinä testin 1 A116 15 %:n näytteen laskut olivat siis seuraavanlaiset:

$$21,25 \cdot 10^4 \cdot \left(\frac{500}{10000}\right) = 106250 \text{ solua/ml}$$

$$\frac{20000 \text{ solua}}{106250 \text{ solua/ml}} = 188 \mu\text{l}$$

Testissä 2 (d43 ja d44) haluttu solumäärä oli 25000. A116-linjan näytetilavuus oli 500 µl ja Regea08/023-linjan 1 %:n ja 5 %:n näytteillä 500 µl ja 10 %:n ja 15 %:n näytteillä tilavuus oli 1 ml. Laskut laskettiin tavalla 1. Pipetointimäärät löytyvät taulukosta 12. Testin 1 A116 soluista tehtiin rinnakkaiset näytteet ja testin 2 soluista tehtiin kaikista olosuhteista neljä rinnakkaista näytettä.

Taulukko 12. Tavalla 1 lasketut sytospin näytetilavuudet

A	pipetoitava näytetilavuus, µl				
testi 1 d77	1 %	5 %	10 %	15 %	HUOM
näytetilavuus 500 µl A116	162,6	174	(285) 250	188	10 % otettiin 250 että saatiin rinnakkaiset
näytetilavuus 200 µl 08/023	(166,6) 200	(625) 200	(416) 200	(400) 200	liian vähän soluja -> kaikkiin 200

B	pipetoitava näytetilavuus, µl				
testi 2 d43	1 %	5 %	10 %	15 %	HUOM
näytetilavuus 500 µl A116 d43	15,8	26,2	31,4	23,5	kaikista näytteistä tehtiin 4 rinnakkaista
eri näytetilavuudet 08/023 d44	11	13	50	30	500 µl 1 % ja 5 %, 1 ml 10 % ja 15 %

Sytospinlaskut

Testin 2 (d76 ja d77) laskettiin muuten samoin mutta näytetilavuus jätettiin huomioimatta.

$$\text{lasketut solut} \cdot 10^4 = \text{solua/ml} \quad ; \quad \frac{\text{haluttu solumäärä}}{\text{solua/ml}} = \text{pipetoitava tilavuus}$$

Testin 2 (d76 ja d77) laskuissa tilavuus on unohdettu huomioida, joten määrät eivät ole haluttuja. Taulukossa 13 on pipetoidut määrät ja oikein lasketut määrät, jotka olisi kuluunut pipetoida halutun solumäärän saamiseksi.

Taulukko 13. Testin 2 (d76 ja d77) lasketut sytospinnäytetilavuudet

	pipetoitava näytetilavuus, µl				
testi 2 d76 ja d77	1 %	5 %	10 %	15 %	HUOM
näytetilavuus 200 µl A116 d76	44	56	69	47	kaikista näytteistä tehtiin 2 rinnakkaista
näytetilavuus 200 µl A116 oikeinlaskettu	219	278	347	236	
näytetilavuus 200 µl 08/023 d77	192	104	104	81	
näytetilavuus 200 µl 08/023 oikeinlaskettu	962	521	521	403	

08/023																	
Testi 08/023	1																
	1 %				5 %				10 %				15 %				
	Best	Pigment	Dapi	Huom	Best	Pigment	Dapi	Huom	Best	Pigment	Dapi	Huom	Best	Pigment	Dapi	Huom	
kuva	1	0	4	15													
	2	0	1	30		1	10	24	bestissä todella vahva tausta	0	8	36		1	ei kuvaa	33	
	3	2	0	8		13	18	33		0	27	47		4	20	30	
	4	0	1	11		4	12	49		3	13	40		10	29	40	
	5	2	0	9		4	40	50		5	24	41		7	19	25	
	6	0	1	30		7	24	59		0	12	54		4	26	40	
	7	0	9	15		10	25	52		1	36	40		7	23	34	
	8	10	7	12						5	17	38		3	26	41	
	9									1	15	34					
	10																
Testi 08/023	2																
	1% A				5% A				10% A				15% A				
	Best	Pigment	Dapi	Huom	Best	Pigment	Dapi	Huom	Best	Pigment	Dapi	Huom	Best	Pigment	Dapi	Huom	
kuva	1																
	2	0	0	9		0	0	19		0	0	39		0	0	31	
	3	0	0	8		0	0	13		0	1	25		0	0	29	
	4					0	0	18		0	3	31		0	0	13	
	5	0	0	6		0	1	18		0	1	28		0	1	10	
	6	0	0	10		0	0	38		0	1	17		0	0	31	
	7	0	0	10		0	0	47		0	0	12		0	1	11	
	8	0		6		0	0	6		0	0	13		0	0	31	
	9	0	0	12										0	1	19	
	10	0	0	6										0	2	20	
	11													0	2	19	
	12																
	13																
	14																
Testi 08/023	2																
	1% B				5% B				10% B				15% B				
	Best	Pigment	Dapi	Huom	Best	Pigment	Dapi	Huom	Best	Pigment	Dapi	Huom	Best	Pigment	Dapi	Huom	
kuva	1																
	2	0	0	6		0	0	21									
	3	0	0	12		0	1	1		0	0	7	3.5 ja 5 sama kuva	0	1	26	
	4	0	0	9		0	0	39		0	0	9		0	3	33	
	5	0	0	6		0	0	32						0	1	26	
	6	0	0	10		0	0	40						0	0	49	
	7	0	0	7		0	1	25						0	3	31	
	8	0	0	9						0	0	9		0	2	56	
	9	0	0	8						0	0	11		0	0	48	
	10	0	0	8						0	0	8		0	0		
	11	0	0	7						0	2	7					
	12	0	0	9						0	5	7		0	1	33	
	13	0	0	8						0	1	5					
	14	0	0	5						0	1	2					
	15	0	0	5						0	0	10					
	16	0	1	6						0	2	11					
										0	0	8					
Testi 08/023	3																
	1 %				5 %				10 %				15 %				
	Best	Pigment	Dapi	Huom	Best	Pigment	Dapi	Huom	Best	Pigment	Dapi	Huom	Best	Pigment	Dapi	Huom	
kuva	1																
	2	0	11	16		0	27	32		0	16	19		0	13	21	
	3	0	26	41		0	15	20		0	12	19		0	11	27	
	4	0	8	35		0	12	15		0	16	18		0	17	19	
	5	0	10	15		0	14	19		0	21	23		3	15	25	
	6	0	7	12		0	14	15		0	17	30		0	32	45	
	7	0	10	12		0	14	19		0	19	25		0	23	26	
	8	0	15	20		ehkä 1	0	16	24	besti todella haaileita pisteiltä	0	21	22		0	23	31
	9	0	12	27			0	12	17		0	17	22		0	14	25
	10	0	17	30		ehkä 1		14	19		0	22	27		0	14	19
	11	0	12	33										0	18	22	
	12	0	25	37													
	13																
	14																

MITF

[illegible]

Bestrophin-1

A116

Testi A116	1																
		1 %				5 %				10 %				15 %			
		Best	Pigment	Dapi	Huom	Best	Pigment	Dapi	Huom	Best	Pigment	Dapi	Huom	Best	Pigment	Dapi	Huom
kuva	1																
	2	3	18	34		0	9	27		1	11	22		ei kuvaa	0	7	14
	3	0	14	24		0	11	22		1	7	10			0	10	30
	4	0	10	19		0	15	30		0	4	8			0	13	24
	5	2	20	41		0	9	39		1	8	15			0	6	27
	6									0	5	13			1 ei kuvaa	0	30
	7														0	9	19
	8														0	12	20
	9																
	10																
	11																
	12																
	13																
	14																
Testi A116	2																
		1% A				5% A				10% A				15% A			
		Best	Pigment	Dapi	Huom	Best	Pigment	Dapi	Huom	Best	Pigment	Dapi	Huom	Best	Pigment	Dapi	Huom
kuva	1																
	2	0	1	21		0	2	29		0	1	28		0	15	26	
	3	0	0	30		0	1	31		0	1	30		0	2	24	
	4	0	0	34		0	2	28		0	3	35		0	2	32	
	5	0	1	21		0	1	25		0	4	41	4 ja 6 sama kohta	0	2	33	
	6	0	1	24		0	3	35		0	3	37	4 ja 6 sama kohta	0	4	33	
	7	0	1	21		0	2	37		0	2	29		0	2	38	
	8	0	1	15		0	5	40		0	2	25		0	3	38	
	9	0	0	33						0	0	38					
	10	0	2	13													
	11																
	12																
	13																
	14																
Testi A116	2																
		1% B				5% B				10% B				15% B			
		Best	Pigment	Dapi	Huom	Best	Pigment	Dapi	Huom	Best	Pigment	Dapi	Huom	Best	Pigment	Dapi	Huom
kuva	1																
	2	0	2	43		0	0	21		0	2	17		0	1	29	
	3	0	1	32		0	2	14		0	2	34		0	2	33	
	4	0	1	35		0	0	18		0	4	37		0	3	46	
	5	0	0	33		0	0	19		0	3	44		0	3	42	
	6	0	3	34		0	1	30		0	7	40		0	4	41	
	7	0	3	32		0	3	19		0	5	37		0	2	56	
	8	0	5	18		0	2	28		0	5	31		0	2	62	
	9					0	1	19						0	5	32	
	10					0	2	36									
	11																
	12																
	13																
	14																
Testi A116	3																
		1 %				5 %				10 %				15 %			
		Best	Pigment	Dapi	Huom	Best	Pigment	Dapi	Huom	Best	Pigment	Dapi	Huom	Best	Pigment	Dapi	Huom
kuva	1	0	18	28		0	17	26		0	21	36		0	19	34	
	2	0	24	33		0	24	29		0	25	37		0	22	31	
	3	0	27	31		0	15	26		0	21	33		0	18	36	
	4	0	21	27		0	25	37		0	0	25	43		0	18	25
	5	0	30	37		0	19	29		1	25	41	best ei varma posit.	0	24	27	
	6	0	35	44		0	20	32		0	30	46		0	23	34	
	7	0	21	29		0	18	29		7	23	42		0	43	54	
	8					0	26	34						0	25	34	
	9																
	10																
	11																
	12																
	13																
	14																

MITF

Testi A116	1	1 %				5 %				10 %				15 %			
		MITF	Pigment	Dapi	Huom	MITF	Pigment	Dapi	Huom	MITF	Pigment	Dapi	Huom	MITF	Pigment	Dapi	Huom
kuva	1																
	2	3	6	24		0	25	66		0	22	40		0			
	3	0	9	21	mitf vahva tausta, v	0	18	37		0	22	37		0	7	24	mitf 4 erottuvaa
	4	4	7	24		0	18	56		8	20	44		0	11	26	
	5	0	9	25	mitf ei hohtava, jok	0	10	36		2	28	42		0	7	18	
	6	1	19	39		0	12	29	(4 selkeää, ei hohtav	0	17	32		0	13	36	
	7	0	12	34		0	9	29		0	21	53		0	9	20	
	8	0	18	39										0	10	29	mitf 1 jossa hohtavia pilkkuja
	9	2	27	65										0	13	36	
	10																
	11																
	12																
	13																
	14																
Testi A116	2	1% A				5% A				10% A				15% A			
		MITF	Pigment	Dapi	Huom	MITF	Pigment	Dapi	Huom	MITF	Pigment	Dapi	Huom	MITF	Pigment	Dapi	Huom
kuva	1																
	2	0	0	35		0	1	33		0	4	25		0	1	23	
	3	0	2	45		0	4	47		0	1	35		0	3	50	
	4	0	1	48		0	0	37		0	3	24		0	2	32	
	5	0	0	49		0	0	37		0	2	40		0	6	14	
	6	0	1	28		0	4	38		0	2	17	mitf 2 hohtavia pilkk	0	5	15	
	7	0	17	39		0	1	34		0	4	28		0	1	26	
	8	0	3	31		0	5	34		0	2	51		0	1	47	
	9	0	3	33		0	1	31		0	3	27		0	4	53	
	10	0	0	70		0	1	33		0	4	28		0	2	42	
	11	0	2	40													
	12	0	0	48													
	13	0	22	58													
	14																
Testi A116	2	1% B				5% B				10% B				15% B			
		MITF	Pigment	Dapi	Huom	MITF	Pigment	Dapi	Huom	MITF	Pigment	Dapi	Huom	MITF	Pigment	Dapi	Huom
kuva	1																
	2	0	1	52		0	1	22		0	4	22		0	0	30	
	3	0	2	53		0	0	20		0	2	20		0	1	35	
	4	0	0	42		0	1	27		0	4	33		0	0	31	
	5	0	2	31		0	2	29		0	2	42		0	6	20	
	6	0	1	51		0	1	31		0	2	40		0	2	29	
	7	0	2	27		0	3	24		0	3	23		0	2	37	
	8	0	1	18		0	2	24		0	2	24		0	1	33	
	9	0	3	31		0	0	30		0	3	48		0	10	39	
	10	0	1	23		0	3	33		0	0	55		0	1	45	
	11	0	11	31	1 sulussa hohtava p	0	2	45									
	12	0	4	26		0	4	69									
	13					0	2	47									
	14																
Testi A116	3	1 %				5 %				10 %				15 %			
		MITF	Pigment	Dapi	Huom	MITF	Pigment	Dapi	Huom	MITF	Pigment	Dapi	Huom	MITF	Pigment	Dapi	Huom
kuva	1	1	17	19		0	15	19		0	15	21		2	19	27	
	2	0	13	19		0	12	14		0	17	19	mitf 3 kirkkaampia	0	19	24	
	3	0	16	18		1	26	33	mitf todella haalea	3	3	31	34	2	22	31	
	4	1	12	18		0	10	23		0	13	19	mitf 3 kirkkaampia	0	20	27	mitf, monessa punaisista pisteistä
	5	2	24	30	mitf ei erityisen hoh	0	19	27		12	27	41	mitf, muutamassa v	2	16	26	mitf, monessa punaisista pisteistä
	6	0	21	22		0	23	35		2	23	38		1	21	32	
	7	0	18	21		0	19	23		0	16	25	mitf 3 kirkkaampia	1	1	27	
	8	0	14	19		0	9	20		8	35	44	mitf, monissa punaisista pisteistä				
	9	0	13	20		0	22	29	mitf 2 hohtavia pisteistä								
	10																
	11																
	12																
	13																
	14																

Liite 3. NanoDrop tulokset

Report

Test type: Nucleic Acid

12.10.2011 14:05

Exit

Report Name

Report Full Mode

Ignore

▼

Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor abs.	340 raw
vesi	Default	12.10.2011	14:00	0.33	0.008	0.019	0.42	0.67	40.00	230	0.012	-0.057
A116 1%	Default	12.10.2011	14:01	19.49	0.487	0.239	2.04	0.06	40.00	230	8.368	-0.025
A116 5%	Default	12.10.2011	14:02	11.67	0.292	0.137	2.12	0.04	40.00	230	7.681	-0.016
A116 10%	Default	12.10.2011	14:03	6.15	0.154	0.059	2.60	0.02	40.00	230	8.958	-0.043
A116 15%	Default	12.10.2011	14:04	18.74	0.469	0.259	1.81	0.17	40.00	230	2.730	-0.040
vesi2	Default	12.10.2011	14:04	0.10	0.002	0.023	0.10	-0.21	40.00	230	-0.012	-0.055